

**UNTERSUCHUNGEN ZUR NEUROLOGIE UND
ZEREBRALEN INFLAMMATION NACH TIEF
HYPOTHERMEM KREISLAUFSTILLSTAND DER RATTE:
EINFLUSS DER
WIEDERERWÄRMUNGSGESCHWINDIGKEIT**

NADJA DERTINGER

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(Direktor : Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. Phys. E. Kochs)
und aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen
Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner

Vorgelegt über das
Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Erhard)

**UNTERSUCHUNGEN ZUR NEUROLOGIE UND
ZEREBRALEN INFLAMMATION NACH TIEF
HYPOTHERMEM KREISLAUFSTILLSTAND DER RATTE:
EINFLUSS DER
WIEDERERWÄRMUNGSGESCHWINDIGKEIT**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Nadja Dertinger
aus
Hanau

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. Erhard
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion:

20. Juli 2007

Meinem Vater

You know a dream is like a river, ever changing as it flows.
And a dreamer's just a vessel that must follow where it goes.
Trying to learn from what's behind you and never knowing what's in store
makes each day a constant battle just to stay between the shores.
And I will sail my vessel 'til the river runs dry.
Like a bird upon the wind, these waters are my sky.
I'll never reach my destination if I never try,
So I will sail my vessel 'til the river runs dry.
Too many times we stand aside and let the water slip away.
To what we put off 'til tomorrow has now become today.
So don't you sit upon the shore and say you're satisfied.
Choose to chance the rapids
and dare to dance the tides.

(Garth Brooks, song "The River" co-written with Victoria Shaw)

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Extrakorporale Zirkulation mit Herz-Lungen-Maschine	2
2.1.1	Defizite nach EKZ	3
2.1.1.1	Ätiologie und Pathophysiologie	3
2.1.1.2	Prävention durch Emboli-Reduktion	6
2.2	Tief hypothermer Kreislaufstillstand (Deep Hypothermic Circulatory Arrest, DHCA)	7
2.2.1	Zentralnervöse Schäden bei Kindern	8
2.2.2	Ätiologie und Pathophysiologie	10
2.3	Immunologie	15
2.3.1	Zytokine	16
2.3.1.1	Die Akute-Phase-Reaktion nach Gewebeverletzung	17
2.3.1.2	Die systemische Entzündungsreaktion im Rahmen des kardiopulmonalen Bypasses (CPB)	18
2.3.2	Zytokine als Entzündungsmediatoren	20
2.3.2.1	Proinflammatorische Zytokine	21
2.3.3	Enzyme	31
2.3.3.1	Zyklooxygenase-2 (COX-2)	31
2.3.3.2	p38 Mitogen-aktivierte Kinase (p38 MAPK)	34
2.3.4	Wiedererwärmungsmethoden und ihre Auswirkungen	36
2.3.4.1	Temperaturmanagement	37
2.3.4.2	Wiedererwärmungsrate	38
2.3.4.3	Zusammenhang von Sauerstoffsättigung und Temperatur	39
3	Eigene Untersuchungen	42
3.1	Zielvorstellung	42
3.2	Tiere, Material und Methodik	43
3.2.1	Versuchstiere	43
3.2.2	Versuchsplan	44
3.2.2.1	Chirurgische Präparation	45
3.2.2.2	Extrakorporale Zirkulation	48
3.2.2.3	Tief Hypothermer Kreislaufstillstand (DHCA)	50
3.2.2.4	Reperfusion und Wiedererwärmung mit EKZ	50
3.2.2.5	Abgang von Extrakorporaler Zirkulation und Nachbeatmung	52
3.2.2.6	Nachbeobachtungsphase	53
3.2.3	Untersuchung der neurologischen Funktion	53
3.2.3.1	Zeitlicher Verlauf	54
3.2.3.2	Erfassung und Bewertung	54
3.2.4	Entnahme und Untersuchung des Gehirns	62
3.2.5	Untersuchungen auf der molekular-biologischen Ebene	63
3.2.5.1	Western Blot	63
3.2.5.2	Histologie	68
3.3	Statistische Bewertung der Befunde	70
3.4	Ergebnisse	71
3.4.1	Physiologische Parameter der operativen Phase	71
3.4.2	Neurologische Parameter	74
3.4.3	Inflamationsparameter	80
3.4.4	Ergebnisse der HE-Färbung	83
3.4.5	Bildübersicht HE-Färbung	86
3.4.6	Bildübersicht NF-kB-/NeuN-positive Neurone	87

4	Diskussion.....	88
4.1	Diskussion der Methoden.....	88
4.1.1	Der tief hypotherme Kreislaufstillstand (DHCA) im Modell	88
4.1.2	Neurologische Untersuchung	90
4.1.3	Western Blot Analyse.....	94
4.1.4	Doppelfärbung aktivierten NF-kB in Kombination mit NeuN	95
4.1.5	Beurteilung des Gewebeschadens anhand der HE-Färbung.....	97
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	98
4.2.1	Physiologische Variablen	98
4.2.2	Betrachtung des neurologischen Defizits und der Inflamationsparameter COX-2, Ik-B, NF-kB, sowie der Histologie im Kontext des tief hypothermen Kreislaufstillstandes mit Wiedererwärmung	103
4.2.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	109
5	Zusammenfassung	110
6	Summary	112
7	Literaturverzeichnis	113
8	Tabellenverzeichnis	143
9	Abbildungsverzeichnis	144
10	Abkürzungsverzeichnis.....	146
11	Danksagung.....	150

1 Einleitung

Die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Herzchirurgie, die Einführung innovativer chirurgischer Techniken und neuer Geräteausstattung, aber auch die Gewinnung neuer Kenntnisse der neonatalen Physiologie und Pathophysiologie haben zu einem beträchtlichen Fortschritt bei der Behebung kongenitaler Herzdefekte bei Neugeborenen und Kleinkindern beigetragen (COOLEY, 1997; LAUSSEN, 2001). So konnte seit Einführung der Extrakorporalen Zirkulation (EKZ) vor nahezu fünf Jahrzehnten eine signifikante Reduzierung der Morbidität und Mortalität, die mit Operationen am Herzen assoziiert sind, erreicht werden (SELNES et al., 2006). Dennoch liegt die Inzidenz neurologischer Morbidität bei Kindern nach solchen korrektiven Eingriffen heute immer noch bei 30 % (PUA und BISSONNETTE, 1998). Diese entwicklungs- und verhaltensbedingten Störungen werden dabei erst manifest, wenn die Kinder das Kindergarten- oder das Schulalter erreichen und können Auswirkungen bis in das Berufsleben der Betroffenen haben (BELLINGER et al., 1999; MAJNEMER und LIMPEROPOULOS, 1999; MAHLE und WERNOVSKY, 2004). Welche Pathomechanismen allerdings hierbei eine Rolle spielen, ist bisher nicht genau bekannt. Und so diskutiert man heute neben zerebraler Hypoperfusion und Mikroembolien v.a. die zerebrale Inflammation als wichtigen ätiologischen Faktor. Viele der herzchirurgischen Interventionen sind erst unter Verwendung der EKZ möglich und oftmals v.a. bei Kleinkindern mit kongenitalen Herzdefekten nur in Kombination mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (HOVELS-GURICH et al., 1997). Dabei ist bekannt, dass EKZ an sich zu einer verstärkten Freisetzung systemischer Entzündungsparameter führen kann (BAKER et al., 1972; WASS et al., 1998a), die dann in der Lage sind, die Expression zerebraler Inflammationsmarker zu induzieren (HINDMAN et al., 2001). Die Hypothermie während EKZ und DHCA schützt zwar auf der einen Seite durch Reduktion der Stoffwechselrate den gesamten Organismus und v.a. die Ischämie-anfälligen Neurone. Andererseits aber verlängert sie durch die notwendige Wiedererwärmung die Dauer der EKZ, was wiederum mit einem schlechteren neurologischen Ergebnis assoziiert ist. Deshalb gibt es Überlegungen, die Wiedererwärmung nach DHCA zu optimieren. Bisherige Studien zur Wiedererwärmung allerdings befassen sich lediglich mit der mild hypothermen EKZ und lassen den tief hypothermen Kreislaufstillstand dabei außer Acht. Ziel der vorliegenden Studie ist es deshalb, zu untersuchen, welchen Einfluss zum einen zwei unterschiedliche Wiedererwärmungsstrategien nach DHCA (schnell und langsam) auf

postoperative neurologische Defizite haben. Zum anderen soll die Rolle der zerebralen Inflammation nach DHCA bei der Entstehung neurologischer Defizite bestimmt werden.

2 Schrifttum

2.1 Extrakorporale Zirkulation mit Herz-Lungen-Maschine

Der extrakorporale Kreislauf (EKZ) stellt eine „Blutumleitung außerhalb des Körpers zur zeitweiligen Ausschaltung des Herzens oder eines Kreislauf-, bzw. Gefäßabschnittes bei Operationen am eröffneten Herzen bzw. an großen Blutgefäßen“ dar. Insbesondere „an großen Arterien als pumpenloser arterioarterieller Shunt nach Ausklemmen des erkrankten Abschnitts, meist aber als venoarterielle Umleitung des Gesamtkreislaufs über eine Herz-Lungen-Maschine (kardiopulmonaler Bypass)“ kommt die EKZ zum Einsatz (ROCHE LEXIKON, 2003). Seit ihrer erfolgreichen Anwendung 1954 durch (GIBBON, 1954), wurden große Fortschritte in der Herzchirurgie, Anästhesie und der Perfusionstechnik erzielt (GILL und MURKIN, 1996). Die EKZ ist mittlerweile ein standardisiertes Verfahren, das jedes Jahr beispielsweise bei über 15000 Kindern in den USA zum Einsatz kommt (MAHLE WT et al., 2004; MAHLE et al., 2004). In Deutschland werden jährlich ca. 65000 (PRONDZINSKY et al., 1997) und weltweit etwa 800000 Operationen am Herzen mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt. Der Herzklappenersatz und der koronare arterielle Bypass werden heutzutage erfolgreich eingesetzt. Die Mortalität nach EKZ liegt bei 0,5 bis 5 %, wobei von dieser Art Eingriff in der Regel ältere Personen mit bereits bestehenden komorbiden Erkrankungen betroffen sind (COSGROVE et al., 1984). Obwohl die Gesamtmortalität gesunken ist, stieg die Inzidenz der Todesfälle, die durch neurologische Defizite ausgelöst werden, von 7,2 auf 19,6 % an (INVESTIGATORS, 1994). Nach der Wiederherstellung der kardialen Funktion ist oftmals der Erfolg der Operation durch neurologische oder neuropsychologische Dysfunktionen beeinträchtigt (GILL und MURKIN, 1996).

2.1.1 Defizite nach EKZ

Neurologische Dysfunktionen nach Operationen am Herzen unter dem Einsatz der EKZ werden bei 7 % bis 61 % aller Patienten beobachtet, wobei die Mortalität mit 29 % angegeben wird (GILMAN, 1990). Beim Erwachsenen schwankt die Inzidenz der neurologischen Morbidität zwischen 7 und 87 %, Schlaganfälle treten bei 2 bis 5 % aller Fälle auf, während die Inzidenz bei Kindern, die sich einer EKZ unterziehen müssen, auf 30 % angestiegen ist (PUA und BISSONNETTE, 1998). 1985 erfolgten allein in den USA über 37000 Herzoperationen an Kindern unter 15 Jahren (FERRY, 1990). Zusammenfassend lassen sich bei Säuglingen und Kindern als Folge des chirurgischen Eingriffs Schlaganfälle, diffus hypoxisch-ischämische Läsionen, akutes Chorea-Syndrom, Rückenmarksläsionen, intrakranielle Hämorrhagie, zerebraler Infarkt, diffuse kortikale Atrophie und Krämpfe feststellen (FERRY, 1990; KAULITZ R et al., 1997). Postoperative neurologische Dysfunktionen stellen somit eine schwerwiegende Komplikation pädiatrischer Eingriffe am Herzen dar. Dies kann sowohl zu einem ungünstigen chirurgischen Ergebnis als auch einem verlängerten Krankenhausaufenthalt führen (PARK und NECHES, 1993).

2.1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie

Die genaue Ätiologie kognitiver Dysfunktionen nach EKZ ist bis heute unbekannt und scheint multifaktoriell bedingt zu sein. So geht man davon aus, dass sowohl präoperative Vorerkrankungen, die Entwicklung von Mikroemboli, eine intraoperativ bestehende zerebrale Hypoperfusion, sowie eine postoperativ auftretende Hyperthermie den weiteren Verlauf beeinflussen (KIRKLIN et al., 1987; GILL und MURKIN, 1996). Während einer EKZ werden Zehntausende von Mikroemboli (Gas und korpuskulär) erzeugt, wobei viele von ihnen bis in die zerebralen Blutgefäße gelangen können (MOODY et al., 1995). Diese Emboli können auf verschiedene Weise entstehen: Einerseits werden sie exogen durch die Interaktion von Blut mit Fremdoberflächen innerhalb der EKZ-Apparatur erzeugt, wie z.B. Thrombozyten-Fibrin-Aggregate. Andererseits können sie endogen über die Freisetzung atheromatösen Materials oder aber über die Mitnahme von Luft aus dem Operationsfeld entstehen. Die Emboli exogenen Ursprungs entsprechen Zelltrümmern oder Ablagerungen aus dem OP-Feld, die durch die Rückgabe des abgesaugten Blutes während des Eingriffs zugeführt werden oder aber auch durch Injektionen in das venöse Reservoir selbst gelangen (BROOKER et al.,

1998; BORGER et al., 2001; ALDEA et al., 2002). Durch Verbindung des rechten Atriums mit der venösen Drainage der EKZ verbleibt oftmals Luft in der venösen Kanüle. Diese Luft kann nicht vollständig über einen Netzentstörfilter eliminiert werden (JONES et al., 2002) und stellt somit ein erhöhtes Risiko für die Entstehung zerebraler Luftemboli während der Einleitung der EKZ dar (BORGER et al., 2001). Gleichzeitig besteht die Gefahr einer postoperativen Thromboembolie bei Patienten mit kongenitalen Herzdefekten. Dabei handelt es sich z.B. um Patienten mit einem bestehenden hypo-plastischen Linksherzsyndrom, die sich dann einer bidirektionalen „Glenn Shunt“ oder „Fontan Operation“ unterziehen müssen (DU PLESSIS et al., 1995). Die Ursache hierfür ist der intrakardiale Rechts-Links-Shunt, der bei Patienten mit cavopulmonaler Anastomose nach Glenn oder einer fenestrierten Fontan entsteht und ein erhöhtes Risiko für Embolien birgt. Bei der fenestrierten Fontan-OP wird im Falle funktionsloser Herzkammern eine Verbindung zwischen der rechten Vorkammer und der Lungenschlagader unter Umgehung der Herzkammer geschaffen. Dabei wird die Vena cava inferior (IVC) und superior (SVC) über eine intraarterielle Kommunikation mit den Pulmonalarterien verbunden. Z.B. nach Verschluss einer fenestrierten Fontan ist das Risiko der Entstehung eines Thrombus im linken Herzen mit subsequenter Embolie signifikant hoch.

GOLD et al. (1995) und HARTMAN et al. (1996) konnten im Zusammenhang mit chirurgischen Eingriffen am Herzen und postoperativ auftretenden Schlaganfällen eine Verbindung von intraoperativ auftretender Hypotension und einem schlechteren neurologischen Ergebnis nachweisen. Ein Bezug zwischen Makroembolien und einer globalen zerebralen Hypoperfusion scheint vorhanden zu sein (GOLD et al., 1995; HARTMAN et al., 1996). Ebenso vermutet man, dass atheromatöse Emboli zerebrale Gefäße verstopfen können und somit zur Hypoperfusion beitragen, sollte die kollaterale Perfusion durch eine systemische Hypoperfusion herabgesetzt sein (SILLESEN et al., 1988). Man geht aber davon aus, dass ein höherer Perfusionsdruck zu der Entfernung gashaltiger Emboli führt und somit eine Verbesserung des Blutflusses der vorher ischämischen Region bewirkt. In dieser Hinsicht konnten weitere Beweise geliefert werden. In der Kernspinresonanztomographie konnte nach Erhöhung des Perfusionsdrucks ein progressiven Abfall des zerebralen Blutflusses bei Schweinen gezeigt werden (MUTCH et al., 1997).

Die Effekte einer bestehenden intranschämischen Hyperthermie auf das neurologische Outcome sind schon seit einiger Zeit bekannt (COOK, 2001). Dies ist der Grund, warum Forschungsgruppen sich der Frage widmen, ob postischämische Hyperthermie ebenso einen negativen Einfluss auf den neurologischen Status der Patienten haben kann. Besonders im

pädiatrischen herzchirurgischen Bereich ist die Wirkung von postoperativer Hyperthermie von Interesse (BISSONNETTE et al., 2000). Dies liegt vor allem daran, dass Kinder eine größere Tendenz als Erwachsene aufweisen, eine postoperative Hyperthermie zu entwickeln. Die Gründe dafür sind noch unklar (COOK, 2001). Man geht davon aus, dass der Grund für eine postoperativ auftretende Hyperthermie der operative Eingriff oder aber die Konsequenz aus einer vorher bestehenden Hypothermie ist. Ebenso wird ein Zusammenhang mit dem Einsatz der extrakorporalen Zirkulation vermutet. Sowohl durch den chirurgischen Eingriff als auch durch den Einsatz der EKZ wird eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, die sich klinisch in generalisierter Vasodilatation, Hyperthermie und postoperativen Blutungen äußern kann (BAKER et al., 1972; WASS et al., 1998a). In einer Studie bei Kindern konnte gezeigt werden, dass durch Hämofiltration eine Auswaschung der Zytokinmediatoren und somit eine Reduktion der maximalen Körpertemperatur in den ersten 24 Stunden postoperativ erzielt werden kann (JOURNOIS et al., 1996). Man geht also davon aus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen endogenen Pyrogenen wie Zytokinen, und zerebraler Hyperthermie besteht. Auch konnte experimentell eine Beteiligung des zentralen Nervensystems gezeigt werden. Innerhalb von sechs Stunden nach Hyperthermie (40 °C) des gesamten Körpers sind pathologische Veränderungen, wie degenerative Prozesse der Neuronen im menschlichen Gehirn nachweisbar (SMINIA et al., 1994). Gleichzeitig besteht eine Korrelation zwischen zerebraler Hyperthermie (40 °C) und persistierenden Verhaltensveränderungen (SHUM-TIM et al., 1998). Biochemisch ist z.B. ein Anstieg des extrazellulären Glutamats bei zerebraler Hyperthermie und Ischämie bei Katzen zu verzeichnen (TAGUCHI et al., 1995). Man vermutet, dass exzitotoxische Vorgänge bei neuronalen Verletzungen und die damit verbundene Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren postoperativ zu Krämpfen bei Kindern führen (NEWBURGER et al., 1993). In einer Studie mit Zellkulturen (Astrozyten), die intra- und postoperativ Hyperthermie ausgesetzt wurden, konnte nachfolgend ein kontinuierlicher und signifikanter Anstieg des extrazellulären Glutamats gezeigt werden (BISSONNETTE et al., 1999).

2.1.1.2 Prävention durch Emboli-Reduktion

Die richtige Platzierung der Kanülen kann entscheidend für das Endergebnis sein. Wird die Kanüle in ein Gebiet mit atheromatösen Plaques verbracht, so kann dies eine direkte Abschwemmung des atherosklerotischen Materials in die Aorta bewirken. Die Platzierung der Kanüle distal der zerebralen Blutgefäße allerdings vermag die Embolibelastung zu verringern (BORGER et al., 1999). Ein weiteres Risiko stellen korpuskuläre oder Lipid beladene Materialien dar, die ihren Ursprung in der Sternotomie haben. Sie sind aufgrund ihrer geringen Größe oder aber durch Deformation fähig, den Netzentstörfilter in der EKZ zu passieren und so in den Kreislauf zu gelangen. Die Menge diesen „Risikomaterials“ kann durch die Aufbereitung von Blut vor der Rückleitung in das venöse Reservoir vermindert werden. Bei dieser Technik ist es von besonderer Bedeutung, die Balance zwischen einer Minimierung korpuskulärer Anteile im Blutkreislauf einerseits und einer Auswaschung von Thrombozyten und Koagulationsfaktoren andererseits zu schaffen. Da die Freisetzung von atheromatösen Plaques mit dem späteren Auftreten von Schlaganfällen assoziiert ist, sollte eine Verletzung der atheromatösen Aorta vermieden werden. Sowohl die trans-ösophageale Echokardiographie als auch die sonographische Untersuchung der Aorta hat diesbezüglich große Fortschritte gebracht (GROCOTT und NUSSMEIER, 2003).

2.2 Tief hypothermer Kreislaufstillstand (Deep Hypothermic Circulatory Arrest, DHCA)

In der Herzchirurgie, insbesondere bei Anwendung eines DHCA bei Kindern, sind in den letzten 25 Jahren große Fortschritte gemacht worden. Sowohl die Überlebensrate konnte erhöht, als auch Gehirnschädigungen, verursacht durch anhaltende Hypoxie oder Zyanose bei Kindern mit kongenitalen Herzdefekten, konnten reduziert werden (EHYAI et al., 1984; FERRY, 1990; WONG et al., 1992b; MILLER et al., 1995). So ermöglicht die Anwendung des DHCA im Rahmen von herzchirurgischen Interventionen ein sowohl von Perfusionskanülen freies, als auch blutarmes Operationsfeld, das die anatomische Rekonstruktion erleichtert wird (FERRY, 1987, 1990). Ein weiterer Vorteil der tiefen Hypothermie besteht in ihrem neuroprotektiven Effekt durch metabolische Suppression, und damit auch geringeren Verbrauch zerebraler energiereicher Phosphate („High energy phosphates“) (SWAIN et al., 1991; AOKI et al., 1993; HIRAMATSU et al., 1995). Diese Faktoren fördern so die Ischämietoleranz. Von größerem Interesse könnte allerdings die Beobachtung der inhibitorischen Effekte auf exzitotoxische und andere schädliche Zellprozesse sein, welche durch Hypothermie erzielt werden (BUSTO et al., 1987; BUSTO et al., 1989b; BUCHAN und PULSINELLI, 1990; ROKKAS et al., 1995). Darüber hinaus wird die Aktivierung der endothelialen Leukozyten signifikant reduziert (LE DEIST et al., 1995).

Die technischen Fortschritte in der Herzchirurgie haben sowohl die Mechanismen, als auch das damit verbundene Risiko für neurologische Schäden bei Kindern mit kongenitalen Herzdefekten verändert. Neuere Methoden führten zu einer Abnahme der Mortalität. So können Kinder mit kongenitalen Herzdefekten, die früher noch als letal galten, heute trotz verschiedener Komplikationen wie kardiovaskuläre Vor- und Begleiterkrankungen, schlechtem Allgemeinzustand und Schock operiert werden und haben eine bessere Überlebenschance. Ein weiterer Fortschritt ist, dass intrakardiale Korrekturen heute oftmals im Neugeborenenalter möglich sind (GREELEY et al., 1989).

Trotz eines deutlichen Rückganges der Mortalität, existiert eine erhebliche neurologische Morbidität nach erfolgter Operation am Herzen (DU PLESSIS, 1997). Neurologische Schädigungen stellen mit die gravierendsten und meist gefürchteten Folgeerscheinungen herzchirurgischer Eingriffe mit DHCA dar (AMIR et al., 2005). Das Auftreten einer neuro-

logischen Dysfunktion nach erfolgter Herzoperation ist 12,5 mal größer als nach einem Gefäß- oder Thoraxeingriff (SMITH et al., 1986).

2.2.1 Zentralnervöse Schäden bei Kindern

Kongenitale Herzdefekte stellen die häufigsten angeborenen Geburtsschäden dar, wobei ein Drittel der Betroffenen chirurgische Intervention bereits in frühester Kindheit benötigt (GILLUM, 1994). In den USA werden jährlich etwa 35000 Kinder mit schwerwiegenden kongenitalen Herzdefekten (CHD) geboren und mehr als ein Drittel dieser Kinder benötigt bereits im ersten Lebensjahr palliative oder chirurgische Intervention (CASTANEDA, 1992; GILLUM, 1994). Kinder, die im ersten Lebensjahr operiert werden, haben laut DITTRICH et al. (2003) ein erhöhtes Risiko postoperativ neurologische Defizite zu entwickeln. Davon besonders betroffen sind Kinder mit komplexen Fehlbildungen am Herzen und lediglich palliativen Therapiemöglichkeiten. Das Gesamtrisiko, neurologische Ausfallerscheinungen zu entwickeln, erhöht sich um ein vielfaches bei den Kindern, denen noch zusätzliche chirurgische Maßnahmen bevorstehen (DITTRICH et al., 2003).

Obwohl ein Rückgang der Morbidität bei Kindern zu verzeichnen ist, wurde in Verlaufsuntersuchungen gezeigt, dass postoperativ bei bis zu 25 % der Überlebenden Störungen im Hinblick auf Neurologie und Entwicklung zu beobachten sind (FERRY, 1987). Ein erheblicher Anteil dieser Kinder weist kognitive Defizite, neurologische Ausfälle und im schulfähigen Alter schlechtere schulische Leistungen auf (MAJNEMER und LIMPEROPOULOS, 1999). Neuromotorische Störungen wie z.B. eine Hemmung der Grob- und Feinmotorik, sowie das Vorliegen einer Hypotonie in frühester Kindheit ist bei Kindern mit kongenitalen Herzdefekten dokumentiert (LIMPEROPOULOS et al., 2002). Die Persistenz dieser Beeinträchtigungen auf lange Sicht ist noch unklar. Eine Studie, die die Prävalenz persistierender entwicklungsbedingter Schädigungen bei Kindern mit kongenitalen Herzdefekten (CHD) untersucht, zeigt, dass sie für grob- und feinmotorische Defizite bei 42 %, insbesondere bei Neugeborenen, liegt (LIMPEROPOULOS et al., 2002). Auch andere Untersuchungen unterstreichen dies. Andere Studiengruppen (HOVELS-GURICH et al., 1997) berichten von postoperativ auftretenden Störungen der Grob- und Feinmotorik bei Kindern im Alter von drei bis neun Jahren mit Transposition der großen Arterien (TGA) und sehen sie als vorherrschende Schädigungen an. Auch BELLINGER et al. (1999) zeigen in ihrer Studie, in der sie entwicklungsbedingten neurologischen Status bei Kindern im Alter

von vier Jahren nach „Hypothermic cardiac arrest“ (HCA) und „Low flow Bypass“ (LFB), dass vor allem die Kinder aus der HCA-Gruppe Schwierigkeiten bei der Bewältigung von grob- und feinmotorischen Aufgaben, aber auch in der Anwendung von Sprache haben. Sie zeigen eine höhere oromotorische und faziale Frequenz (z.B. Lidschlag) eine Unterentwicklung im Gebrauch der Hände und Füße. Bei der Bewertung der Sprache zeigen sich größere Abweichungen z.B. in den willentlich beeinflussten oralen Bewegungen (z.B. Reflexe/Erwiderungen auf die Befehlskette „Zunge rausstrecken“), der Artikulation und der mehrsilbigen Wiedergabe. Sowohl die Apraxie der Sprache als auch Beeinträchtigungen in der Grobmotorik sind mit der Dauer des DHCA assoziiert (BELLINGER et al., 1999). Der Effekt der DHCA-Dauer wird ebenfalls im sogenannten „Boston Circulatory Arrest Trial“ aufgegriffen, der ganz ähnliche Resultate zeigt. Eine längere Dauer des DHCA ist verbunden mit schlechteren Ergebnissen in der Artikulation (getestet mit dem Mayo Test) und Störungen in Grob- und Feinmotorik (WYPIJ et al., 2003). Eine andere Arbeitsgruppe sieht sogar einen definitiven Zusammenhang zwischen niedrigerem IQ und einer längeren DHCA-Dauer (OATES et al., 1995). Zwar konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der DHCA-Dauer und mathematischer Fertigkeiten oder dem Lesen gefunden werden (WYPIJ et al., 2003) und es ist auch in den Bereichen Mathematik und Lesen keine Differenzierung in den Behandlungsmethoden (DHCA und LFB) festzustellen. Dennoch sind Sprachstörungen häufig anzutreffen, ebenso wie Schwierigkeiten in der Koordination von Auge-Hand, im angewandten logischen Denken, der Lokomotorik und im persönlich-sozialen Bereich (LIMPEROPOULOS et al., 2002). Mit Erreichen des schulfähigen Alters können Störungen von Gleichgewicht und Koordination verbunden sein mit Limitationen in der Freizeitgestaltung und somit das Zusammenspiel mit Gleichaltrigen, wie auch die soziale Integration ungünstig beeinflussen. Erschwerend kommt hinzu, dass in den ersten Schuljahren 30 bis 60 % aller Aktivitäten feinmotorischer Art sind, wie z.B. das Schreiben mit der Hand. So können auf weite Sicht persistierende motorische Beeinträchtigungen sekundär Auswirkungen auf Sozialisierung, Selbstwertgefühl und die berufliche Laufbahn eines Kindes haben (MCHALE und CERMAK, 1992).

2.2.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Mit der Einführung neuer medizinischer Methoden treten meist ebenso neuartige wie unerwartete Komplikationen auf. So berichten zahlreiche Untersuchungen von neurologischen Spätfolgen wie Krampfanfällen (fokal und generalisiert), Choreoathetosis, Enzephalopathien (EHYAI et al., 1984; FERRY, 1990; WONG et al., 1992a; MILLER et al., 1995), Hemiparesen, veränderter Muskeltonus, Dyskinesien, Verhaltensauffälligkeiten (hirnorganisches Psychosyndrom), selten periphere Nervenläsionen (z.B. Horner-Syndrom) oder Rückenmarksläsionen (nach Korrektur einer Aortenisthmusstenose) (FERRY, 1987).

Choreoathetotische Bewegungsstörungen wurden 1962 erstmalig nach kardiopulmonaler Bypassoperation in tiefer Hypothermie erwähnt (BJORK und HULTQUIST, 1962). Choreoathetose ist eine Dyskinesie, die sich bei Kindern zwischen sechs und zwölf Monaten postoperativ nach ischämischen Insulten manifestieren kann (JONAS, 1998). In bisherigen Studien werden verschiedene Ursachen des akuten Choreasyndroms diskutiert. (KUPSKY et al., 1995) vermutet eine Unterbrechung der Leitungsbahnen des Pallidum als Auslöser einer akuten Choreoathetosis, nachdem neuropathologische Befunde zweier untersuchter Kinder vorlagen, die degenerative Veränderungen im Globus pallidus aufwiesen. Einige Computertomographische Untersuchungen zeigen morphologische Veränderungen der Basalganglien, welche auf einen hypoxisch-ischämischen Insult hinweisen (BRUNBERG et al., 1974; HORI et al., 1991; STRAUSSBERG et al., 1993). Experimentelle und klinische Veröffentlichungen verweisen auf mikroskopische Läsionen oder eine Störung der Synthese und Aufnahme von Neurotransmittern hin (MOLINA et al., 1984; ROBINSON et al., 1988). Mehrfach wird auch ein direkter Zusammenhang zwischen den Methoden kardiopulmonaler Bypass und hypothermer Kreislaufstillstand bei Herzoperationen gesehen. Die Dauer des Kreislaufstillstandes variiert in vorliegenden Studien von sieben bis siebenzig Minuten bei einer Temperatur von 15 bis 20 °C. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass bei einer Stillstanddauer von weniger als 30 min und einer Temperatur zwischen 15 und 20 °C nicht mit neurologischen Schäden zu rechnen ist (TREASURE et al., 1983). Es liegen aber auch konträre Berichte vor, die eine signifikante Erhöhung der Inzidenz der Entwicklung einer Choreoathetosis bei Patienten mit DHCA (< 25 °C) und einer Stillstanddauer von mehr als einer Stunde (DELEON et al., 1990) aufweisen. Laut Untersuchungen, die sich über einen Zeitraum von vier Jahren bei 19 Patienten erstreckten, wird die postoperative Choreoathetosis in Zusammenhang mit dem Vorhandensein von großen aortopulmonalen Kollateralarterien

gesehen (WONG et al., 1992b). Dies wird auch in neueren Studien bestätigt, in denen davon ausgegangen wird, dass es zu einem Überlaufen („run-off“) von systemischen Blut in den Lungenkreislauf kommt und somit eine effektive zerebrale Perfusion nicht mehr gewährleistet werden kann (AUER und MAIR, 2001). Resultat sind eine lokale Ischämie und die damit verbundenen klinischen, neurologischen Symptome (WONG et al., 1992b). Diese Symptome treten unabhängig vom Alter transient oder persistierend auf. In ihrer Verlaufsform variieren sie von mild mit Beschränkung auf die distalen Gliedmaßen bis zu Choreoathetose sowohl der Extremitäten als auch der Rumpfmuskulatur mit parallel auftretender Muskelhypotonie. Eine aufrechte Haltung und Sitzen kann dadurch stark eingeschränkt sein. Sprachstörungen und Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme werden bedingt durch eine Beteiligung der orofazialen Muskulatur. Am Auge kann eine supranukleäre Ophthalmoplegie bestehen, wobei keine Bewusstseinsstörung vorliegt. Im Schlaf sistiert die Symptomatik (KAULITZ R et al., 1997). Die Inzidenz wird in der Literatur mit 2 bis 12 % angegeben (BRUNBERG et al., 1974). Medikamentöse Therapie ist bisher umstritten, da der Effekt auf die Symptomatik noch nicht eindeutig geklärt ist (WONG et al., 1992b).

Auch die Ursachen für das Auftreten von Krämpfen sind multifaktoriell. So geht man nach experimentellen Studien davon aus, dass sich mit steigender Dauer (> 40 min) des tief hypothermen Kreislaufstillstandes das Risiko für die Entstehung von neurologischen Schäden erhöht (NEWBURGER et al., 1993). Ein möglicher Mechanismus wird dabei in der Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat gesehen, die postischämisch einen verzögerten Zelltod bewirken sollen (REDMOND et al., 1994). Exzitotoxizität wurde erstmals im Zusammenhang mit exzessiver Stimulation extrazellulärer exzitatorischer Aminosäurerezeptoren von OLNEY in den 70er Jahren beschrieben (zitiert nach CHOI und ROTHMAN, 1990). Unter physiologischen Bedingungen vermitteln diese Rezeptoren exzitatorische Effekte der Dikarboxylsäure Glutamat, ein ubiquitärer und vielfältiger Neurotransmitter im ZNS. Neurone, vorausgesetzt sie verfügen über die entsprechenden Glutamat-Rezeptoren, können bei exzessiver Glutamatfreisetzung über eine neurotoxische Kaskade in den Zelluntergang geführt werden. Eine vermehrte Stimulation der N-Methyl-D-Aspartat - (NMDA) Rezeptoren, die einerseits ausgelöst wird durch einen Anstieg von Glutamat im Bereich der Synapsen, möglicherweise auch durch andere Neurotransmitter wie Glyzin, und andererseits durch eine Depolarisation der Membran verbunden mit ischämischen Prozessen, führt an den NMDA-Rezeptorkanälen zu dem lethalen Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} in das betroffene Neuron (MCDONALD und JOHNSTON, 1990). Für die Pathogenese der Zellzerstörung scheint Exzitotoxizität eine größere Rolle sowohl im juvenilen als auch im

adulten Gehirn zu spielen (GRESSENS, 1999). NMDA-Rezeptoren öffnen sich passiv durch einen Abfall des Membranpotentials, ausgelöst durch beispielsweise einer Hypoxie zu einem Zeitpunkt, an dem der Schwellenwert für Glutamat nicht erhöht ist (NOVELLI et al., 1988; HAMMOND et al., 1994). Man vermutet aber, dass bei Jungtieren eine entwicklungsbedingt festgelegte Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten, die Kanäle mit verlängerter Öffnung und größerem Ca^{2+} -Fluss besitzen, verantwortlich sind für die Förderung physiologischer NMDA-vermittelter Neuronendegeneration (MCDONALD et al., 1988; MCDONALD und JOHNSTON, 1990; MONYER et al., 1994). Andere sehen in der Exzitotoxizität des sich entwickelnden Gehirns die „Achillesferse“ der Neurone, da sie normalerweise von der trophischen Aktivierung exzitatorischer Stimulierung profitieren (JOHNSTON et al., 1995). Es gilt als allgemein anerkannt, dass die Verletzung im Gehirn, ausgelöst durch Hypoxie-Ischämie, begleitet wird von gesteigerten Reizen der Neuronen mit frequenten Krampfanfällen (SARNAT und SARNAT, 1976; WILLIAMS et al., 1992).

Auch andere spezifische Glutamat-Neurotransmitter und Ionenkanäle (z.B. Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoazol-4-Propion-Säure (AMPA) Rezeptoren) sind fähig, eine neurotoxische Kaskade einzuleiten (MCDONALD und JOHNSTON, 1990; STRIJOS et al., 1996). Hohe Kalziumkonzentrationen können eine Mobilisierung von Stickoxidsynthetase (NOS) und damit die Synthese von Stickoxid (NO) bewirken. NO ist ein Regulator, der im Verdacht steht, ebenfalls den Zelltod verursachen zu können (BAUMGARTNER et al., 1999).

Eine zentrale Rolle im Zelluntergang nach hypoxisch-ischämischen Prozessen scheinen Mitochondrien zu spielen (ANKARCORONA et al., 1995). Sie fördern mehrfach Oxidationsreaktionen, die unter oxidativem Stress die sehr toxischen O_2 -Radikale liefern. Mitochondrien sind hierbei Zwischenspeicher für intrazelluläres Ca^{2+} . Diese können aber durch zytoplasmatisches Ca^{2+} , welches sekundär durch die Öffnung von NMDA- und Ca^{2+} -sensitiven Kanälen in die Mitochondrien gelangt, überlastet sein. Damit ist ihre Funktion herabgesetzt und die Energie nicht ausreichend, um die Ionengradienten an den Membranen zu erhalten. Ein „Circulus vitiosus“ mit Depolarisation der Membran und Öffnung der NMDA-Rezeptor-Kanäle ist in Gang gesetzt (NOVELLI et al., 1988). Kernspinresonanztomographische Untersuchungen bei Tieren und Kindern weisen darauf hin, dass ein Mangel an Energie und erhöhte Laktatwerte im Gehirn mit Neuronendegeneration nach Asphyxie assoziiert sind (HANRAHAN et al., 1998).

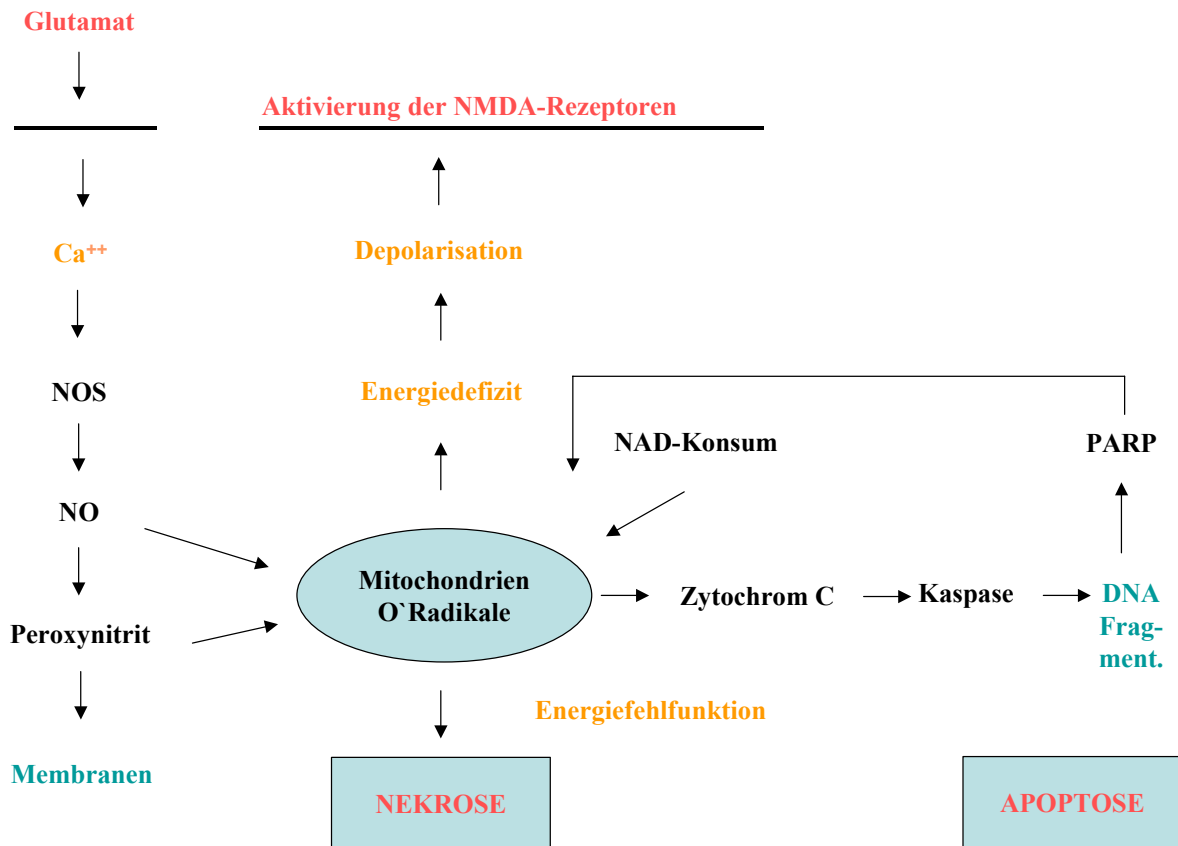


Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der neurotoxischen Kaskade, modifiziert nach (JOHNSTON et al., 2001).

Die globale zerebrale Ischämie ist mit ihren zellulären und molekularen Mechanismen pathophysiologisch von Interesse, da sie in direkter Beziehung zu CPB und DHCA bei Herzoperationen steht. Sie nimmt somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung neurologischer Defizite v.a. bei Kindern ein. Nach einem globalen ischämischen Ereignis sind Neurone bestimmter Regionen des Gehirns vom Zelltod betroffen. Dieses Phänomen der selektiven Schadensanfälligkeit ist sowohl im juvenilen, als auch im adulten Gehirn anzutreffen. So sind Neurone und Oligodendrozyten in Neokortex und Hippokampus von Neonaten selektiv anfällig für den Zelltod nach DHCA (LAPTOOK et al., 1994; MUJSCE et al., 1994; BOTTIGER et al., 1998; KURTH et al., 1999). In diesem Zusammenhang zeigt auch Magnetic Resonance Imaging (MRI) der letzten Jahre ein spezielles Bild symmetrischer Schäden in Thalamus, Putamen und im peri-rolandischen zerebralen Kortex nach Asphyxie bei Kindern (MENKES und CURRAN, 1994). Das neurologische Bild selektiver Schäden in den Basalganglien und im Kortex ist klinisch verbunden mit permanenten schweren

motorischen Beeinträchtigungen wie Lähmungserscheinungen, eingeschränkte Funktionalität der Extremitäten (mit einer Prävalenz der oberen Extremität) und einer Beeinträchtigung der Sprachfähigkeit (MENKES und CURRAN, 1994). Experimentelle Studien belegen, dass das spezielle Bild der Schädigung durchaus die Dysfunktion einer bestimmten Gruppe exzitatorischer neuronaler Kreisläufe, die den selektiven neuronalen Untergang einleiten, reflektiert (MCDONALD und JOHNSTON, 1990). Jede schadensanfällige Region ist Ziel exzitatorischen Glutamatinputs. Sind diese Kreisläufe hyperaktiv z.B. während hypoxisch-ischämischer Enzephalopathien, so sind diese Regionen prädisponiert für Glutamat-medierte Exzitotoxizität (SARNAT und SARNAT, 1976; OLNEY et al., 1986). Auf der anderen Seite wiederum hemmt eine Hyperaktivierung dieser Kreisläufe interne und externe Segmente des Globus pallidus, der zumindest laut MRI nicht die Neigung zur Schädigung während kurzfristiger bis totaler Asphyxie zeigt (HOON et al., 1997). Diese Inhibition des Globus pallidus, pars interna reduziert die Inhibition des Thalamus, und führt zu einer gesteigerten Stimulierung des zerebralen Kortex (JOHNSTON und HOON, 2000).

Neuronaler Zelltod beruht grundsätzlich auf zwei verschiedenen Mechanismen: Nekrose oder Apoptose. Nekrose wird u.a. durch eine zu lange Dauer einer ischämischen Schädigung, verursacht durch Adenosintriphosphat (ATP)-Depletion, hervorgerufen. Der übermäßige Verbrauch bzw. Verlust an ATP führt zu einer Fehlfunktion der Na^+/K^+ -Pumpe und somit zu einer massiven osmotischen Diffusion von Na^+ , Cl^- und Wasser in die Zelle. Resultat ist ein Anschwellen der Zelle (MURDOCH und HALL, 1990). Der hohe intrazelluläre Anteil von Na^+ bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran mit Öffnung der Ca^{2+} Kanäle und einer intrazellulären Akkumulation von Ca^{2+} . Kalziumionen aktivieren weiter intrazelluläre Proteasen und Lipasen, welche die Zellmembran und intrazelluläre Organellen zerstören. Histopathologisch zeigt sich das Bild eines angeschwollenen Neurons mit eosinophilem Zytoplasma und pyknotischem Nukleus und sekundärer inflammatorischer Reaktion in der Umgebung (THOMPSON, 1995). Im Gegensatz zur Nekrose, die einen irreversiblen und passiven Vorgang darstellt, ist die Apoptose eine aktive Form des Zelltodes. Sie beinhaltet eine gezielte Fragmentierung zellulärer DNA in einem definierten Prozess. Dieser Vorgang benötigt Energie zur Induktion bestimmter Gene und somit eine erhöhte Expression von Proteinen wie p53, die den Zelltod vorantreiben (YONISH-ROUACH et al., 1991). Dadurch wird eine stückweise Auflösung der Zellmembran ermöglicht, um dann von ansässigen Makrophagen vollständig phagozytiert zu werden (THOMPSON, 1995; THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998). Im Zentrum dieser Vorgänge stehen die Caspasen, insbesondere Caspase-8 und -3, die zu der Familie der Zystein-Proteasen gehören (THORNBERRY und

LAZEBNIK, 1998). Zwei verschiedene Wege der Aktivierung von Caspase-3 sind möglich. Im extrinsischen System aktivieren klassische Inflammationsfaktoren wie Fas und TNF α , Kaspase-8 über Rezeptoren an der Zelloberfläche. Caspase-8 wiederum aktiviert Caspase 3, die dann Proteine des Zytoskeletts und schließlich die DNA zerstören. Im intrinsischen System wird Caspase-3 durch Zytochrom c, freigesetzt von nicht mehr funktionsfähigen Mitochondrien, mobilisiert (KURTH et al., 1999). Histopathologisch sind eine Karyorrhexis des Nukleus und eine Margination des Chromatins im Nukleus, und lediglich geringfügige Veränderungen des Zytoplasmas und der Inflammation zu sehen (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998).

2.3 Immunologie

Im Rahmen von pädiatrischen, chirurgischen Eingriffen ist ein kardiopulmonaler Bypass (CPB) während der chirurgischen Intervention oftmals unumgänglich. Gleichzeitig wird der CPB als einer der Auslöser für eine systemische Inflammationsreaktion diskutiert. Diese bewirkt u.a. eine Aktivierung des Komplement- und Koagulationssystems, eine Stimulierung der Zytokinproduktion, eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten mit Degranulation, eine Stimulierung der Thrombozyten und eine endotheliale Dysfunktion (KIRKLIN et al., 1983). Diese Veränderungen können zu einer eingeschränkten Organtätigkeit mit nachfolgender erhöhter Morbidität und Mortalität v.a. in der postoperativen Phase führen (BRIX-CHRISTENSEN, 2001). Die systemische Entzündungsreaktion wurde bisher hauptsächlich bei Erwachsenen beschrieben, während die Vorgänge bei Kindern noch weitgehend ungeklärt sind (WAN et al., 1997; BRIX-CHRISTENSEN et al., 1998).

Bis zu 50 % der Kinder, welche sich eines CPB innerhalb einer Herzoperation unterziehen, zeigen klinisch eine reduzierte pulmonale und kardiovaskuläre Funktion mit postoperativen Infektionen (SEGHAYE et al., 1993). Bei 3 bis 7 % der Kleinkinder tritt postoperativ eine Nierenfunktionsstörung auf (PICCA et al., 1995), zudem liegt die Inzidenz für neurologische Ausfallerscheinungen bei bis zu 30 % (PUA und BISSONNETTE, 1998). Da diese Probleme gerade bei Kindern gravierende Folgen für ihre weitere Entwicklung haben, ist hier die Ursachenforschung von besonderem Interesse.

2.3.1 Zytokine

Zytokine stellen Teile von Mediatoren dar, die an der Vermittlung immuno-endokriner Wechselbeziehungen beteiligt sind (IMURA et al., 1991; DEL REY und BESEDOVSKY, 1992). Sie sind u.a. notwendig, um die optimale Funktion der B- und T-Lymphozyten zu gewährleisten und beeinflussen den Glucocorticoid-Spiegel, indem sie die adrenale Achse über das ZNS aktivieren, wodurch dann weiter ACTH stimuliert wird (BENDTZEN und FELDT-RASMUSSEN, 1997). Zytokine werden zur Beurteilung der systemischen Entzündungsreaktion herangezogen, da sie wie Akute-Phase-Proteine und von immunkompetenten Zellen freigesetzte spezifische Entzündungsmarker im peripheren Blut Auskunft über Entzündungsvorgänge im Organismus geben (BRIX-CHRISTENSEN, 2001).

Sie sind interzelluläre Vorläufer, die als Antwort auf unterschiedliche Stimuli verschiedener Gewebe produziert werden. Sie werden allgemein als Produkte reifer Leukozyten (Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten) innerhalb des lymphatischen Systems betrachtet (SOSLAU et al., 1997). Nach neueren Erkenntnissen sind jedoch ebenso andere Zelllinien, wie Endothelzellen (MANTOVANI et al., 1997) und Thrombozyten (SOSLAU et al., 1997) an der Produktion von Zytokinen beteiligt. Ihre Wirkung variiert in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration der einzelnen Zytokine, den Rezeptoren, den Zelltypen, auf die sie einwirken und ist auch von der Präsenz anderer Zytokine abhängig. So besitzen Komplementfaktoren und ihre Abbauprodukte einen immun-regulierenden Effekt, indem sie die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine induzieren (TAKABAYASHI et al., 1996). Gleichzeitig werden erhöhte Werte pro-inflammatorischer Zytokine mit einem negativen Outcome nach chirurgischen Eingriffen am Herzen assoziiert. Ebenso zeigen zahlreiche Studien, dass eine erhöhte Freisetzung bestimmter Zytokine bei Patienten mit Trauma, septischem Schock und Hämorrhagie auftritt und unter Umständen ein Zusammenhang mit gewissen Komplikationen besteht (WAAGE et al., 1989). Diese Zusammenhänge lassen sich besser verstehen, wenn man einzelne Wirkmechanismen näher betrachtet.

2.3.1.1 Die Akute-Phase-Reaktion nach Gewebeverletzung

Die Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion als unspezifische Immunreaktion findet nach einer Gewebeverletzung statt. Dabei ist wichtig zu wissen, dass eine größere Verletzung des Gewebes eine systemische Akute-Phase-Reaktion auslöst, welche eine immer gleich ablaufende Antwort des menschlichen Körpers auf eine Vielzahl von Schädigungen, wie z.B. Infektionen, Traumata und chirurgische Eingriffe darstellt. Hierbei werden Zytokine u.a. von Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen als Mediatoren freigesetzt. Sie sollen mikrobieller Invasion entgegenwirken, den Körper von Fremdkörpern reinigen und zuletzt eine komplette Wiederherstellung des verletzten Gewebes bewirken (TONNESEN et al., 1996). Gerät das lokale Geschehen außer Kontrolle, werden inflammatorische Mediatoren in die Zirkulation freigesetzt, welche wiederum vasoaktiv und chemotaktisch wirken (ASIMAKOPOULOS, 1999). Biochemisch können diverse Marker der Akute-Phase-Reaktion gemessen werden, wie z.B. eine erhöhte Synthese hepatischer Akute-Phase-Proteine (C-reaktives Protein, Fibrinogen, Haptoglobin, Ferritin, Ferrioxidase 1 und Präalbumin) und Aktivierung des Komplementsystems. Weitere Anzeichen einer Akute-Phase-Reaktion sind Leukozytose und Lymphopenie im Blut, sowie erhöhte Werte bestimmter katabolischer Hormone wie Glukagon, Kortisol und Katecholamine, welche die Insulinsekretion unterdrücken. Aus diesem Grund wird die Akutphase auch als Phase des absoluten Insulinmangels bezeichnet. Gleichzeitig können dabei anabolische Hormone wie Insulin und Testosteron, unverändert oder erniedrigt sein. Der gesamte Organismus ist in der postoperativen Phase auf dessen Überleben gerichtet. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Körper in einer hypermetabolen Stoffwechsellage mit erhöhter Wärmeproduktion, negativer Stickstoffbilanz und einem erhöhten Glucosespiegel. Danach schließt sich die Übergangs- oder Postaggressionsphase an, in der nur in inadäquater Form Insulin freigesetzt wird und ein relativer Insulinmangel besteht. In der Peripherie kommt es durch die Freisetzung von Kortisol zu einer Insulinresistenz mit Störung des Glukosetransports in die Zelle. Kortisol führt ebenso zur übermäßigen Proteolyse im Muskel mit gesteigerter Harnstoffsynthese und somit auch zur vermehrten Stickstoffausscheidung mit dem Urin. Die dadurch frei im Blut zirkulierenden Aminosäuren werden für die Glukoneogenese genutzt, da die anfängliche Mobilisation von Glykogen aus Leber und Muskulatur bereits nach wenigen Stunden nicht mehr zur Versorgung des glukoseabhängigen Gewebes ausreicht. Weiterhin dienen die frei im Blut zirkulierenden Aminosäuren der Versorgung einerseits der

glukoseabhängigen Viszeral- und Nervengewebe und andererseits der immunkompetenten Zellen. Die freien Aminosäuren werden auch für die Protein-Neusynthese, wie z.B. zur Herstellung von Akute-Phase Proteinen, und für Reparaturvorgänge im Bereich der Operationswunde genutzt. Eine weitere Möglichkeit der Beschaffung von Glukose des Organismus besteht in der Nutzung glukoplastischer Aminosäuren aus der Muskulatur, lipolytisch freigesetzten Glyzerins und Laktats aus dem anaeroben Stoffwechsel. In der Reparationsphase kehren die antiinsulinerger Hormone in den Normalbereich zurück und somit ist auch die Insulinsekretion weitgehend wieder normal. Eine anabole Stoffwechsellaage stellt sich ein. Letztendlich ist die Akute-Phase-Reaktion ein lokaler, zeitlich begrenzter und vom Körper gut kontrollierter Prozess, welcher nach wenigen Stunden bis Tagen abgeschlossen ist. Klinisch weisen die Patienten mit einer Akute-Phase-Reaktion postoperativ Benommenheit, Fieber und Anorexie auf, wobei der Grad der Symptome abhängig ist vom Ausmaß des chirurgischen Traumas (TONNESEN et al., 1996).

2.3.1.2 Die systemische Entzündungsreaktion im Rahmen des kardiopulmonalen Bypasses (CPB)

Die systemische Entzündungsreaktion kann als Folge einer größeren Gewebeerletzung oder Infektion betrachtet werden, wobei die ursprüngliche Akute-Phase-Reaktion durch bestimmte Faktoren fortschreitet (TONNESEN et al., 1996). Diese inflammatorische Antwort des gesamten Körpers kennzeichnet sich durch eine pulmonale sowie renale Dysfunktion und eine hämodynamische Instabilität aus. Sie kann in schwerwiegenden Fällen zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC), einer Schocklunge („Acute Respiratory Distress Syndrome“, ARDS), einem Schock und final zum Tod führen. Zugrundeliegende Mechanismen sind auch hier die Aktivierung der Komplementkaskade, sowie von Blutzellen, die Freisetzung von Zytokinen und die Induktion der Stickoxidsynthase (PRONDZINSKY et al., 1997). Näher betrachtet kommt es im Rahmen eines CPB zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit Interaktion der zellulären und humoralen Blutbestandteile mit den synthetischen Materialien des extrakorporalen Kreislaufs (Pumpe und Schläuche). Zusammen mit einer Hypothermie und Blutverdünnung im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung der Komplement-, Koagulations- und Kalillikreinkaskade und der Fibrinolyse. Während die Funktion der Thrombozyten beeinträchtigt und die Synthese verschiedener Zytokine erhöht ist, treten vermehrt Leukozyten auf. Deren vermehrtes Auftreten, die gesteigerte Produktion von Zytokinen und anderen inflammatorischen Parametern ist zum

einen Folge der Ischämie (der Blutfluss kann während des CPB um sieben Prozent vermindert sein) (LARSEN, 1995), welche bedingt ist durch eine veränderte Perfusion des Gewebes. Andererseits spielt hier die Reperfusion nach Beendigung des CPB eine wichtige Rolle. Bei der erneuten Durchblutung des Gewebes werden saure Stoffwechselprodukte, sowie lokal produzierte Mediatoren in den Blutkreislauf transportiert und können eine inflammatorische Reaktion in anderen Organen mit nachfolgender Dysfunktion bewirken (KNUDSEN und ANDERSEN, 1990; BUTLER et al., 1993). KIRKLIN et al., 1983 bezeichnen die hier beschriebene systemische Entzündungsreaktion als sog. „Postperfusions-Syndrom“.

2.3.2 Zytokine als Entzündungsmediatoren

Zytokine gehören zur Gruppe der Poly- oder Glykopeptide mit Molekulargewichten zwischen 5 und 70 kDa (BENDTZEN, 1989). Die wichtigsten als Mediatoren an einem Entzündungsgeschehen beteiligten Zytokine sind die pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und die anti-inflammatorischen Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-1ra (IL-1ra).

Die pro-inflammatorischen Zytokine gelten als pyrogen und lösen alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren Symptome wie Apathie, Anorexie, Fieber, Leukozytose, Lymphopenie und eine Synthese von hepatischen Akute-Phase-Proteinen (z.B. Haptoglobin, Plasminogen, Transferrin, Albumin) im peripheren Blut aus. In größeren Mengen bewirken sie Hypotension und können bis hin zu einer Disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) und Schock führen (BENDTZEN, 1988; OKUSAWA et al., 1988).

Inflammationskaskade:

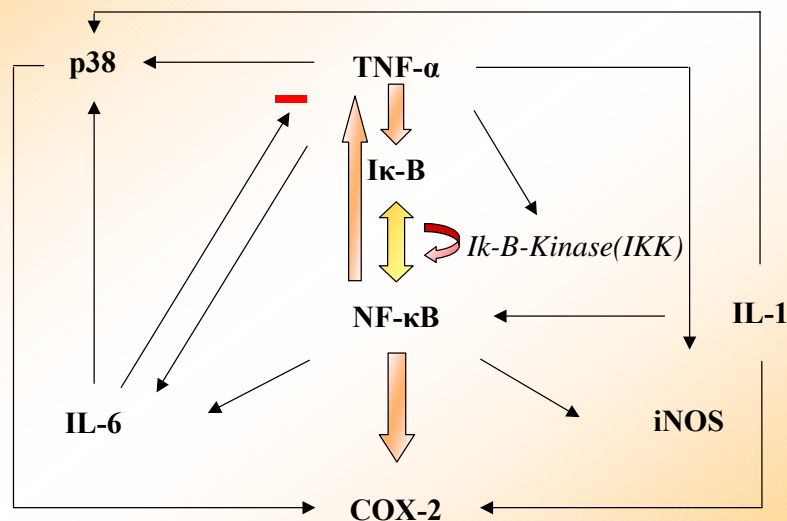


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Inflammationskaskade.

2.3.2.1 Proinflammatorische Zytokine

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)

TNF- α oder Kachektin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17 bis 50 kDa (DENIZOT et al., 1998; WEI et al., 2001) und gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. TNF- α wird als einer der ersten Mediatoren als Antwort auf ein Entzündungsgeschehen freigesetzt (DENIZOT et al., 1998; SASON-TON et al., 2002) und führt in diversen Zelltypen zur Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1). Zusammen mit IL-1 kann dann TNF- α beispielsweise Endothelzellen beeinflussen, wodurch eine Aktivierung der Koagulation erreicht wird (TONNESEN et al., 1996). Man geht sogar davon aus, dass bestimmte Aktivitäten, die bisher TNF- α zugesprochen wurden, auf die Rolle von IL-1 zurückzuführen sind (BEUTLER und CERAMI, 1986; ERTEL et al., 1991). TNF- α wird durch aktivierte Zellen des Immunsystems, z.B. durch Makrophagen, B- und T-Zellen, Mastzellen, aber auch durch Keratinozyten und Fibroblasten produziert (TRACEY und CERAMI, 1993; BAZZONI und BEUTLER, 1996). Ein breites Spektrum organischer und zellulärer Antworten, wie Aktivierung, aber auch Migration von Lymphozyten und Leukozyten, Fieber, die Akute-Phase-Reaktion, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose sind auf TNF- α zurückzuführen (TRACEY und CERAMI, 1993). Systemisch ist es in großen Mengen nach EKZ nachweisbar (SASON-TON et al., 2002).

Rezeptoren und Wirkungsmechanismus

TNF- α wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren: TNF Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF Rezeptor 2 (TNFR2), wobei TNFR1 der vorherrschende Typ ist (VANDENABEELE et al., 1995). Die Bindung von TNF- α an den TNFR1 Rezeptor bewirkt dort eine Trimerisation, womit es zu einer Transduktion der Signalproteine hin zur zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors kommt. Zunächst wird das TNFR1-assoziierte „death domain“ Protein (TRADD) an den Rezeptor gebunden, das den folgenden Proteinen als Plattform dient. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um das „receptor-interacting protein 1“ (RIP1), das „FAS-associated death domain protein“ (FADD) und den „TNF-receptor-associated factor 2“ (TRAF2). Diese Proteine vermitteln u.a. die Aktivierung von NF- κ B und Apoptose (siehe Abbildung 2). RIP1 wird zwar als Schlüsseffektor in der Aktivierung von NF- κ B gesehen (LIU et al., 1996), ist aber nicht essenziell in der Aktivierung dieser „mitogen-activated protein kinases“ (MAPKs) (KELLIHER et al., 1998). Ein weiteres TRADD-interagierendes

Protein ist FADD, das mit der zytosomatischen Domäne von Fas (einem Mitglied der TNFR Superfamilie, das an der Induktion der Apoptose beteiligt ist) kommuniziert (NAGATA, 1999). Durch die Rekrutierung von FADD kann TNFR1 Apoptose induzieren (HSU et al., 1996). Man geht sogar davon aus, dass FADD der Hauptmediator für pro-apoptotische Aktivitäten ist, nachdem man FADD-defiziente Fibroblasten beobachtete, die allerdings noch partiell eine Sensitivität für TNF- α induzierte Apoptose zeigten (YEH et al., 1998). TRAF2 hat eine weitaus größere Affinität zu TRADD als zu TNFR1 oder TNFR2 hat (PARK et al., 2000). Da nur TNFR1 TRADD als Adapter verwendet (HSU et al., 1995), könnte dies die Erklärung dafür sein, dass TNF- α TNFR1 stärker aktiviert als TNFR2 (LIU et al., 1996). Die Präsenz von TRAF2 im TNFR1 Komplex deutet sogar auf eine Involvement in der Signalisierung von TNFR1 Antworten hin (HSU et al., 1996). Daraus folgern HSU et al., (1995), dass eine vermehrte TRADD (195-315)-Ausschüttung zu einer Aggregation von endogenem TRADD führt und TRAF2 assoziiert ist.

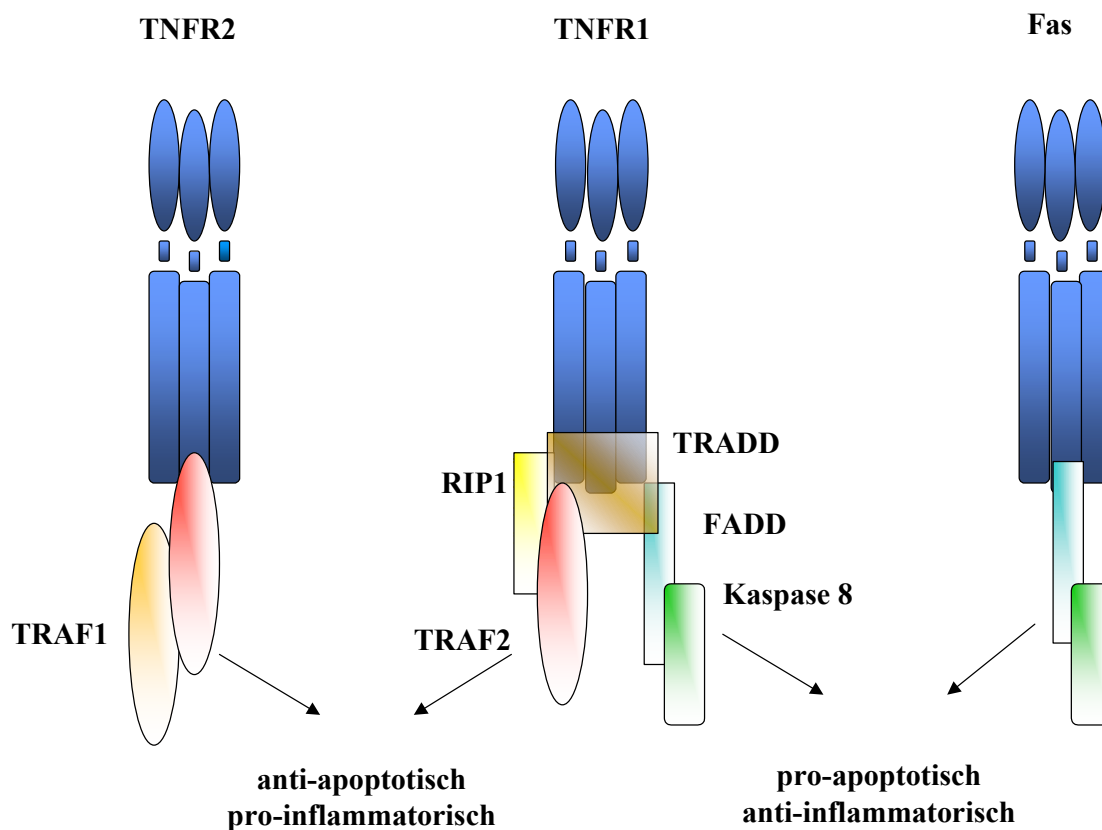


Abbildung 3: Rezeptortypen und deren Verhältnis zu Aktivierung und Inhibition des programmierten Zelltods und Inflammation, modifiziert nach BAUD und KARIN, 2001.

TNF- α im Zentralen Nervensystem (ZNS)

Im ZNS vorhandene, immunkompetente Zellen (Astrozyten, Mikroglia, Neurone) produzieren aufgrund verschiedener pathologischer Stimuli TNF- α . So kann es durch Stressfaktoren wie Infektionen, Verletzungen und Ischämie zu einer deutlichen Erhöhung von TNF- α kommen, was wiederum eine Aktivierung der Astrozyten und Mikroglia bewirkt. Als Bestandteil der Entzündungsreaktion des ZNS stellen diese aktivierten Zellen den Ursprung von TNF- α und wahrscheinlich auch anderer proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1 und IL-6 im Gehirn dar (PERRY et al., 1995). Astrozyten produzieren als Reaktion auf andere Zytokine wie IL-1 β , IFN- γ und TNF- α selbst große Mengen von TNF- α (CHUNG und BENVENISTE, 1990; BENVENISTE et al., 1994). Im intakten ZNS sind Neurone die einzigen Zellen, die kleine Mengen TNF- α unter physiologischen Bedingungen synthetisieren können (BREDER et al., 1993).

Wirkungsorte von TNF- α

Die größte Anhäufung TNF- α –immunreaktiver Neurone im murinen Gehirn ist im dorsomedialen Nukleus des Hypothalamus vorzufinden. Dieser Zellgruppe spricht man eine Beteiligung sowohl an der Ernährung als auch der Glukoseregulation im Organismus zu. Läsionen in diesem Bereich führen z.B. bei der fastenden Ratte zu Hypophagie, Hypodysphagie und sogar reduziertem Wachstum, während bei Tieren mit hohem Kalorien-Regime eine Hyperphagie ausgelöst wird (BELLINGER, 1987; BERNARDIS und BELLINGER, 1987). Gleichzeitig zeichnen sich die Tiere durch eine reduzierte Aktivität der hepatischen Enzyme, welche an der Fettsäuresynthese beteiligt sind, aus und zeigen Veränderungen der basalen und Epinephrin stimulierten weißen Fettgewebslipolyse. Auch andere Regionen, wie der dorsale motorische vagale Nukleus, der bei der Ratte den Magen innerviert (LESLIE et al., 1982), der Nukleus ambiguus (beinhaltet parasympathische präganglionäre Neuronen, die den Ösophagus innervieren) (BIEGER und HOPKINS, 1987) und Bereiche des Nukleus des Traktus solitarius, der viszerale afferente Fasern vom gastrointestinalen System der Ratte erhält, sind an einer TNF- α mediierten Immunreaktion beteiligt. Und auch in der Area postrema (zirkumventrikuläres Organ im kaudalen Bereich des vierten Ventrikels) können TNF- α immunreaktive Fasern festgestellt werden.

Im Zusammenhang mit dem Schlaf-Wach-Zyklus können in all jenen Bereichen des murinen Gehirns TNF- α immunreaktive Strukturen vorgefunden werden, die mit der Regulation der zirkadianen Rhythmik in Verbindung stehen. So spricht man dem suprachiasmatischen

Nukleus die Einstellung des zirkadianen Rhythmus zu (PICKARD und TUREK, 1983). Durch eine intravenöse Verabreichung von TNF- α konnte eine verlängerte Dauer und eine erhöhte Spannung des elektroenzephalischen Dreiecks oder langsame Wellen und herabgesetzte paradoxe Schlafperioden festgestellt werden (SHOHAM et al., 1987). Das mediale präoptische Gebiet soll Neurone enthalten, deren Aktivität mit dem Schlaf-Wach-Rhythmus korreliert. Läsionen innerhalb dieser Strukturen lösen bei der Ratte Insomnie aus. Vermutet wird, dass der Mechanismus über eine Störung der Thermoregulation verursacht wird (SZYMUSIAK et al., 1985). Einzelne Neuronenpopulationen im Hypothalamus lateralis posterior projizieren auf den zerebralen Kortex und Hippokampus der Ratte (SAPER, 1985). (SZYMUSIAK et al., 1989) zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Aktivität bestimmter Zellen im hinteren lateralen Teil des Hypothalamus der Ratte während der Perioden der Schlaflosigkeit genauer auch „aktivem Rapid Eye Moment (REM)“ oder auch paradoxer Schlaf, anstieg.

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 wird (zusammen mit IL-1 und TNF- α) hauptsächlich auf Stimulation von Monozyten/Makrophagen freigesetzt. Aber auch T-Helferzellen (Th2 Zellen) können IL-6 produzieren. Innerhalb der Immunantwort ist IL-6 an der Immunglobulinsekretion und der Aktivierung von T-Zellen beteiligt (AKIRA et al., 1993). IL-6 gehört zu den Regulatoren die pleiotrop sind, deren Rolle nicht genau bestimmt ist und zahlreiche Aufgaben erfüllt. Diese beinhalten die Aktivierung des Leukämie-Hemmfaktors (LIF, leukaemia inhibitory factor) oder auch „Cholinergic differentiation factor“ (CDF), Onkostatin M, IL-11 und „Ciliary Neurotrophic Factor“ (CNTF). Diese Proteine regulieren verschiedene Abläufe wie die Thrombozytenausbildung, Differenzierung der embryonalen Stammzellen, Stimulation der Akute-Phase-Reaktion der Leber, Inhibition der Lipoproteinlipase in Adipozyten und Stimulation des neuronalen Überlebens (PATTERSON, 1992; TAGA und KISHIMOTO, 1997).

Der IL-6 Rezeptor besteht aus einer α - Liganden bindenden Untereinheit und einer gp130 (Zytokinrezeptor) Signalkette (TAGA und KISHIMOTO, 1997). Während neuronaler Verletzungen wird z.B. LIF/CDF induziert, wobei CDF ein Überlebensfaktor für cholinerge Neuronen ist (EO, 1993). Die Zytokine teilen den allgemeinen Signaltransduktor gp 130 in ihren Rezeptoren (TAGA und KISHIMOTO, 1997). Die geteilte Nutzung eines allgemeinen Signalüberträgermoleküls könnte die funktionale Redundanz dieser Zytokine erklären. Eine interessante Konsequenz ist, dass extrazelluläre Anteile von IL-6 und CNTF- spezifische- α - Kettenrezeptoren als lösliche, Ligandenbindende Proteine freigesetzt werden, welche 1. die Bindung dieser Zytokinlöslichen Rezeptorkomplexe an die Membran von gp 130 gerade bei Zellen, welche nicht die entsprechende α -Kette exprimiert, fördert; 2. die Bindung aller Mitglieder dieser Zytokinfamilie an ihre Rezeptoren durch Komplexbildung von gp 130 verhindert; 3. Potenzierung der Halbwertszeit der entsprechenden Zytokine.

Synthese von IL-6 innerhalb des ZNS

Unter physiologischen Bedingungen ist IL-6 mRNA nicht im Gehirn messbar und auch nicht nach Injektion von IL-1 β , allerdings kommt es zu einer schnellen Stimulation seiner Transkription nach Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion (VALLIERES und RIVEST, 1997). IL-6 ist in den größten Mengen im Hippokampus des Rattengehirns messbar und ist sowohl in Gliazellen als auch in Neuronen lokalisiert (SCHOBITZ et al., 1992; GADIENT und OTTEN,

1994). In vitro wird die Expression von IL-6 mRNA in Kulturen kortikaler Neuronen messbar und wird durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β und TNF- α) erhöht (RINGHEIM et al., 1995). In kleinen Mengen wird IL-6 durch unstimulierte Gliakulturen synthetisiert, allerdings wird die Produktion durch inflammatorische Stimuli gesteigert (MIZUNO et al., 1994). Astrozyten hingegen sind fähig aufgrund zahlreicher Stimuli IL-6 zu sezernieren. Dazu gehören auch Zytokine, wie IL-1, TNF- α und TGF- β (FREI et al., 1989; BENVENISTE et al., 1990), LPS (BENVENISTE et al., 1990), Neurotransmitter wie Norepinephrin (MAIMONE et al., 1993), Neuropeptide, wie vasoaktive intestinale Peptide und hypophysäre Adenylatzyklaseaktivierende Polypeptide (MAIMONE et al., 1993; GOTTSCHALL et al., 1994; GRIMALDI et al., 1994), ebenso wie traumatische Nervenverletzungen (HARIRI et al., 1994). Die Produktion von IL-6 in Schwann'schen Zellen erfolgt *in vivo* und *in vitro* nach Nervenverletzungen (BOLIN et al., 1995).

IL-6 hat sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Effekte innerhalb des ZNS (GADIENT und OTTEN, 1997). Im Gehirn wird die IL-6 Produktion durch eine ortsgebundene Immunantwort durch Astrozyten und Mikroglia ausgelöst. Dies wird deutlich durch eine LPS oder IL-1 Injektion, welche eine Biosynthese von IL-6-Rezeptor- α im gesamten Gehirn bewirkt (VALLIERES und RIVEST, 1997). Man vermutet, dass durch eine inflammatorische Kaskade Fieber (OPP et al., 1989) und eine reaktive Gliosis (Proliferation von Gliafasern) (CHIANG et al., 1994) induziert wird und somit zu einer Ausdehnung der krankhaften Prozesse im Gehirn führt. Ebenso löst es aber eine proinflammatorische Zytokinkaskade im ZNS aus (DI SANTO et al., 1996) und bewirkt eine Aktivierung infiltrierender T-Zellen (AKIRA et al., 1993; TAGA und KISHIMOTO, 1997). IL-6 ist ebenfalls fähig sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Wirkung auf Neuronen auszuüben und somit neuronales Überleben oder neuronale Degeneration zu bewirken.

Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa B (NF- κ B)

NF- κ B ist ein ubiquitär induzierbarer Transkriptionsfaktor, der an der Regulation zahlreicher pro-inflammatorischer Gene (CHRISTMAN et al., 1998), aber auch von Matrix-Metalloproteinen und Cyclooxygenase 2 (COX-2) beteiligt ist (siehe Abbildung 2) (BAEUEERLE und BAICHWAL, 1997). Die Aktivierung erfolgt durch Mediatoren wie IL-1, TNF- α (siehe auch Abbildung 2), Lipopolysaccharide, (LPS) (siehe auch Abbildung 4), Wachstumsfaktoren, freie Sauerstoffradikale, oxidativen Stress, UV-Strahlung und virale Infektionen (CHRISTMAN et al., 1998). NF- κ B liegt in inaktiver Form im Zytoplasma von z.B. Endothelzellen und Leukozyten vor (BALDWIN, 1996) und ist dabei gebunden an ein inhibitorisches Protein mit dem Namen „Inhibitor of kappa B“ (I- κ B). Erfolgt nun eine Aktivierung des I- κ B durch einen der beschriebenen Faktoren, wird der NF- κ B-I- κ B-Komplex durch zwei spezifische Kinasen (IKK α /IKK1 und IKK β /IKK2) phosphoryliert und I- κ B abgespalten. Anschließend transloziert NF- κ B zum Nukleus der Zelle, bindet an DNA und induziert die Expression weiterer inflammatorischer Mediatoren wie z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2), induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) und Adhäsionsmoleküle (siehe Abbildung 2) (PAPARELLA et al., 2002).

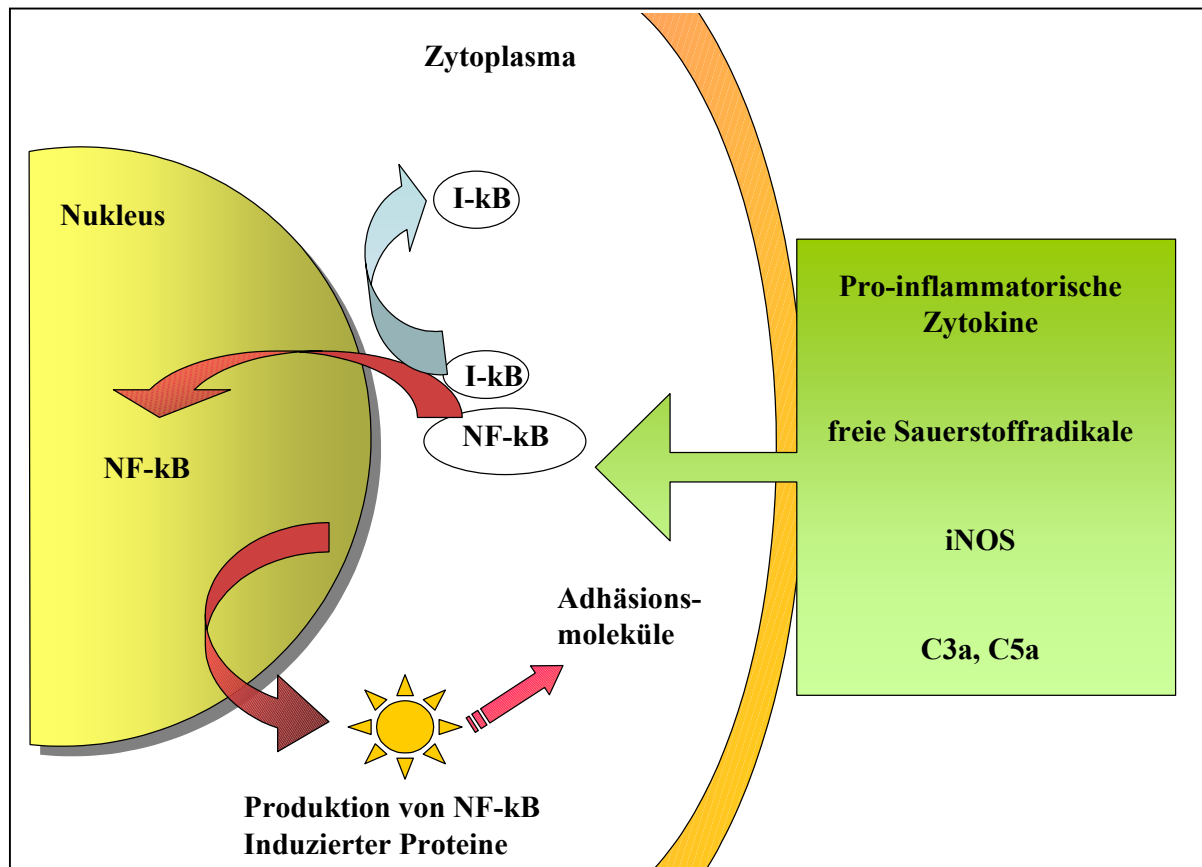


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von NF- κ B in der Zelle, modifiziert nach PAPARELLA et al., 2002.

Eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus supprimiert, indem das I- κ B α -Gen durch NF- κ B induziert wird (LE BAIL et al., 1993). Drei Hauptwege der Aktivierung von NF- κ B sind möglich:

Lipopolysaccharid (LPS) bindet an den Toll-like-Rezeptor-4- (TLR4) – CD14 – MD-2 Komplex an der Zelloberfläche und aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die wiederum die Verstärkung des „myeloid differentiation primary response gene 88“ (MYD88) verursacht. Die „amino-terminale death domain“ von MYD88 interagiert darauf mit der „IL-1-receptor-associated kinase“, IRAK (SILVERMAN und MANIATIS, 2001). Die Aktivierung der IRAK resultiert in der Phosphorylierung des „TNF-receptor-associated factor 6“ (TRAF6) und kann dann Signale über den „complex of transforming-growth-factor- β -activated-kinase 1 (TAK1), TAK1-binding protein 1 (TAB1) – TAB2 zum IKK- Komplex weiterleiten, um eine Aktivierung des NF- κ B -Pfades zu erreichen. Die Aktivierung von NF- κ B durch IL-1 (siehe Abbildung 2) geschieht in gleicher Weise wie durch LPS, da die

zytoplasmatischen, Signal-leitenden Domänen des IL-1 Rezeptors (IL-1R) und der Toll-like-Rezeptoren (TLR's) homolog sind.

Wird NF- κ B durch Zytokine wie TNF oder IL-1 stimuliert (siehe Abbildung 2), so führt dies sowohl zu einer Aktivierung des Aktivatorproteins 1 (AP1) als auch der NF- κ B Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine reguliert. TNF Rezeptoren befinden sich an der Oberfläche zahlreicher Zellen. Durch Rezeptor-Trimerisation und Rekrutierung des Adapterproteins „TNF receptor associated via death domain“ (TRADD) zum zytoplasmatischen Rezeptorende wird der Rezeptor durch TNF gebunden. Im weiteren Verlauf kommt es zur Interaktion von TRADD mit dem Carboxylende von TRAF2 (Adapterprotein), das eine Affinität zu verschiedenen nachkommenden Signalproteinen hat. Mitogen-activated protein (MAP)/ Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK), Kinase Kinase3 (MEKK3) und Receptor-interacting serine/Threonine kinase (RIP) nehmen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Kopplung von TNF zur weiteren Aktivierung der IKKs ein (siehe Abbildung 2) (KELLIHER et al., 1998; YANG et al., 2001).

Um eine T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelte Aktivierung von NF- κ B in peripheren T-Zellen zu erreichen, wird ein weiteres, stimulierendes Signal benötigt, welches einerseits durch CD28 und andererseits durch ein TCR Signal ausgelöst wird. Dies schließt auch die Aktivierung der Proteinkinase C θ (PKC θ) und IKK2 (IKK β) mit ein (ARENDT et al., 2002). PKC θ transloziert rasch zur Plasmamembran der T-Zellen als Antwort auf die Stimulierung der antigen-präsentierenden Zellen oder anti-TCR-CD3 Antikörper. Trimolekulare Komplexe der „membrane-associated guanylate kinase homologue (MAGUK) und der „mucosal-associated lymphoid tissue (MALT)-lymphoma-associated proteins“ BCL-10 und MALT1 werden impliziert, um ein Signal des PKC θ zum IKK-Komplex weiterzuleiten.

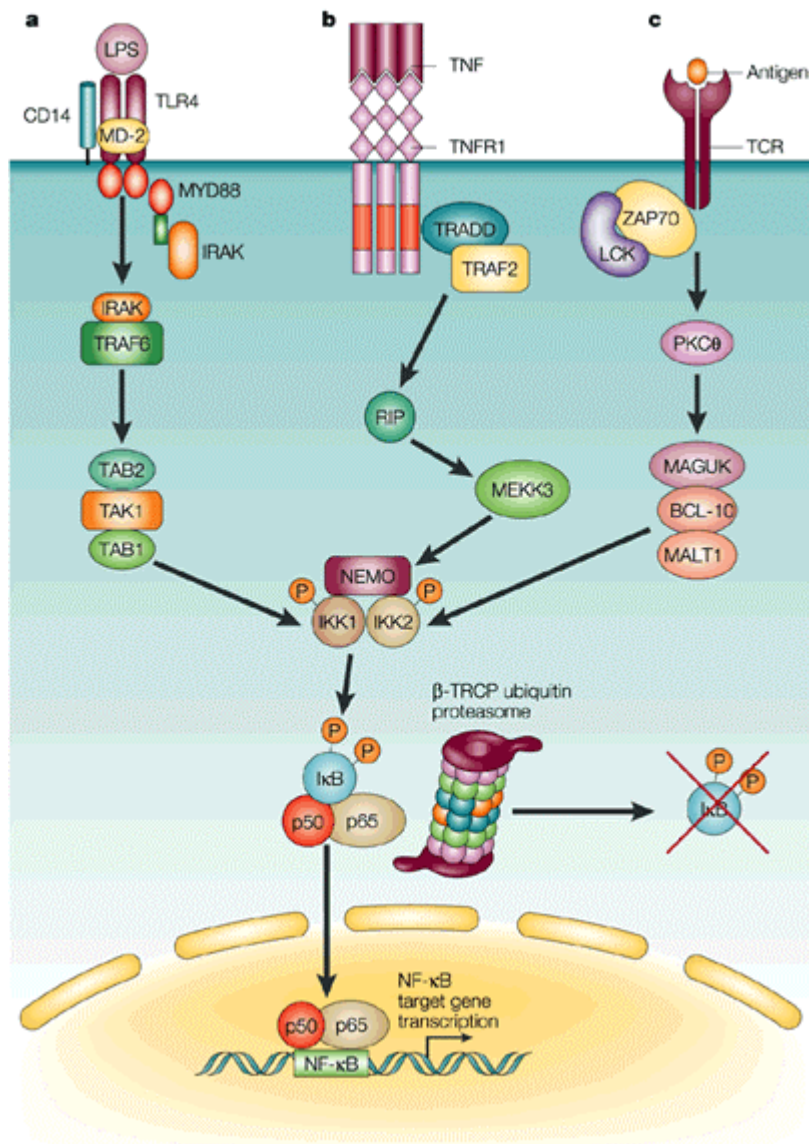


Abbildung 5: NF-κB -Wege der Aktivierung, aus LI und VERMA, 2002.

Man findet NF-κB in immunologischem Kontext, allerdings wird es auch physiologischer Weise im Gehirn z.B. entwicklungsbedingt exprimiert (O'NEILL und KALTSCHMIDT, 1997). Fünf Untereinheiten, p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel bilden Homo- und Heterodimere. Die Aktivierung im Gehirn erfolgt analog der Aktivierung von NF-κB in Körperzellen. Ein weiterer IKK- oder Proteasomen-unabhängiger Pfad der NF-κB Aktivierung soll aber auch möglich sein (BUI et al., 2001). Diverse Untersuchungen weisen eine Aktivierung von NF-κB in Neuronen nach zerebraler Ischämie nach (SCHNEIDER et al., 1999; STEPHENSON et al., 2000; HUANG et al., 2001), ebenso wie in Endothel- und Gliazellen (CARROLL et al., 1998). Im Gehirn sind vorwiegend die Untereinheiten p50 und p65 des NF-κB nachweisbar (ZHANG et al., 2005).

2.3.3 Enzyme

2.3.3.1 Zyklooxygenase-2 (COX-2)

Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase, üblicherweise auch als Zyklooxygenase bezeichnet, lässt sich in die zwei Isoformen Zyklooxygenase-1 (COX-1) und Zyklooxygenase-2 (COX-2) unterteilen (TURINI und DUBOIS, 2002). COX-2 ist das Schlüsselenzym für die Prostaglandinproduktion aus Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure) und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulation von Inflammationsmediatoren (ANGGARD und SAMUELSSON, 1965; TSATSANIS et al., 2006). Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, die in der Membran der Zelle gespeichert wird. Dort liegt sie in veresterter und somit physiologisch inaktiver Form als Lipidbestandteil vor. Durch eine von Phospholipasen katalysierte Deazylierung wird Arachidonsäure freigesetzt (WARNER und MITCHELL, 2004), um dann durch COX (Prostaglandin G/H-Synthase) in Eikosanoide umgewandelt zu werden. Diese Umwandlung geschieht schrittweise, indem zuerst Arachidonsäure in die kurzlebigen Zwischenprodukte Prostaglandin G₂ und Prostaglandin H₂ transformiert wird. Diese werden im weiteren Verlauf entweder via Prostaglandin-Isomerasen zu Prostaglandinen, via Prostazyklin-Synthasen zu Prostazyklinen oder zu Thromboxanen über Thromboxan-Synthasen modifiziert (MINDRESCU et al., 2005). Sowohl COX-1, als auch COX-2 katalysieren die Prostaglandinbildung und bestimmen damit gleichzeitig auch die Entstehungsmenge (RAMSAY et al., 2003). Prostaglandine sind ubiquitäre Lipidmediatoren, die über Membranrezeptoren an der Zelloberfläche eine große Spannweite physiologischer, aber auch pathologischer Prozesse koordinieren (FITZPATRICK und SOBERMAN, 2001). So wirken sie unter physiologischen Bedingungen zellschützend auf die Mukosa des Magens und haben eine Rolle in der Hämostase und in der Hämodynamik der Niere. Unter pathologischen Umständen, wie inflammatorischen oder kanzerösen Prozessen wird ebenfalls die Biosynthese des Prostaglandins induziert (CROFFORD, 1997). Vor kurzem konnte eine dritte Variante, Zyklooxygenase-3 (COX-3) aus kaniner und humaner cDNA des zerebralen Kortex identifiziert werden (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). COX-3 wird im Gegensatz zu COX-1 nicht durch akute inflammatorische Stimuli induziert (SHAFTEL et al., 2003). Man geht davon aus, dass COX-3 eine gehirnspezifische Isoform ist, allerdings liegen noch nicht ausreichend Erkenntnisse darüber vor (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). COX-1 und COX-2 weisen zwar eine 60 %ige Homologie auf (TSATSANIS et al., 2006), dennoch zeigen sie Unterschiede in der Art

und Weise ihrer Expression. COX-1 wird physiologisch von fast allen Körperzellen produziert, während COX-2 als induzierbar gilt und unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben der Säugetiere nicht nachweisbar ist. COX-1 ist die einzige Isoform, die konstitutiv exprimiert wird, was wiederum ihre Beteiligung an physiologischen Abläufen wie Zellschutz des Magens und Thrombozytenaggregation erklärt. In Gehirn, Hoden und Macula densa-Zellen jedoch wird auch COX-2 unter physiologischen Bedingungen exprimiert (SMITH et al., 1996). Die Exposition einiger Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelialzellen, sowie Monozyten mit bakteriellen Endotoxinen, Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren induziert die Expression von COX-2 innerhalb von zwei bis sechs Stunden (HAN et al., 1990; SMITH et al., 2000).

COX-2 im Gehirn

Im Gehirn der Ratte lassen sich in einzelnen neuronalen Zellen, die verteilt sind auf verschiedene Regionen des zerebralen Kortex und des Hippokampus, COX-1 und COX-2 nachweisen. So findet man COX-2 ferner in den Granulazellen des Gyrus dentatus, in den Pyramidalzellen des Hippokampus, dem piriformen Kortex, in den Superficialzellen des Neokortex, der Amygdala und in kleineren Mengen in Striatum, Thalamus und Hypothalamus (YAMAGATA et al., 1993; BREDER et al., 1995). In anderen Regionen wie dem Mittelhirn, der Pons und der Medulla überwiegt COX-1 (YAMAGATA et al., 1993; BREDER et al., 1995). Obwohl COX-2 die vorherrschende Isoform im Hippokampus darstellt, kann auch COX-1-mRNA in einigen Regionen des menschlichen Gehirns nachgewiesen werden (O'NEILL und FORD-HUTCHINSON, 1993). Interessanterweise konnte das COX-2 Protein sowie COX-2-mRNA sowohl in Neuronen als auch in nicht-neuronalen Zellen des ZNS festgestellt werden (YAMAGATA et al., 1993; BREDER et al., 1995). Dies spricht dafür, dass Prostaglandine eine Rolle bei der Signal-Transmission im ZNS spielen. Des Weiteren trägt COX-2 zu fundamentalen Gehirnfunktionen wie synaptischer Aktivität und Gedächtniskonsolidierung bei (MINGHETTI, 2004). So zeigen beispielsweise Ratten, deren cholinerge Neuronen im basalen Vorderhirn in den ersten post-natalen Wochen selektiv zerstört wurden, im Erwachsenenalter herabgesetzte COX-2-, nicht aber reduzierte COX-1-Werte im Hippokampus. Dieser Effekt wird begleitet von einer Schwäche des sozialen Gedächtnisses. Man nimmt dabei an, dass der frühe Verlust hippokampalen cholinergen Inputs die COX-2-Expression in hippokampalen Neuronen beeinträchtigt und die funktionale Rolle der Prostaglandine in synaptischen Aktivitäten ebenfalls beeinflusst (RICCERI et al., 2004). Ein indirekter Beweis der COX-2 Beteiligung an synaptischer Plastizität konnte in

den letzten Jahren durch den Einsatz von COX-2-Inhibitoren, die allerdings keine COX-1 Selektivität besitzen, erbracht werden. Diese COX-2 Inhibitoren wurden Ratten systemisch kurz nach dem Training im Morris-Water-Maze-Test (einem räumlich-kognitiven Test für Nager) verabreicht, woraufhin sie eine verminderte räumliche Gedächtnisfunktion zeigten (TEATHER et al., 2002). Ferner führte eine vor dem Training verabreichte Infusion eines COX-2 spezifischen Inhibitors (Celecoxib®) im Hippokampus adulter Ratten zu einer verminderten Lernfähigkeit im Morris-Water-Maze-Test. Dies führt zu der Annahme, dass die COX-2 Aktivität im Hippokampus sowohl für das Gedächtnis als auch für das Erlernen räumlicher Aufgaben eine wichtige Rolle spielt (RALL et al., 2003). Somit ist eine Modulation der ZNS-Funktion durch selektive COX-2 Inhibitoren möglich. Dieser Sachverhalt spielt vor allem für solche COX-2 Inhibitoren eine entscheidende Rolle, denen eine Säuregruppe fehlt und die deshalb die Blut-Hirn-Schranke passieren können (VANE et al., 1998). Eine Überexpression von COX-2 wird bei Ischämie und Krämpfen mit Neurotoxizität assoziiert (MINGHETTI, 2004). Es wird postuliert, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) produziert wird. Dort erzeugt es neuronale Signale, die dann wiederum das thermoregulierende Zentrum im präoptischen Gebiet des vorderen Hypothalamus aktiviert (BLATTEIS und SEHIC, 1997). Die PGE₂ Synthese wird durch Zytokine wie Interleukin-1 induziert, die wiederum durch Pyrogene wie LPS freigesetzt werden und Fieber auslösen. Obwohl ein Anstieg von COX-2 im ZNS nach LPS-Gaben feststellbar ist, erfolgt die Induktion nicht in Neuronen, sondern im Endothel kranialer Blutgefäße und in der Mikroglia. (CAO et al., 1996; ELMQUIST et al., 1997). PGE₂ hat folglich eine Beteiligung an der febrilen Reaktion, stammend von nicht neuronalen Zellen, die von COX-2 induziert wurden. Bei diesen Zellen nimmt man an, dass es sich um Endothelzellen der Blutgefäße handelt, die für die Durchblutung des Hypothalamus sorgen.

2.3.3.2 p38 Mitogen-aktivierte Kinase (p38 MAPK)

Stress auf Zellen aktiviert intrazelluläre Second-Messenger-Systeme, so auch diverse Proteinkinasen und Phosphatasen. Mitogen -aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die sich der Gruppe der pro-gerichteten Serin-Threonin-Proteinkinasen zuordnen lassen, sind schon seit Langem der Fokus intensiver Studien, da sie evolutionsbedingt in allen Eukaryoten vorkommen und erwiesenermaßen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Nukleus hin einnehmen (DAVIS, 1993; NISHIDA und GOTOH, 1993; HUNTER, 1995; SEGER und KREBS, 1995). MAP-Kinasen kontrollieren solche Mechanismen wie die Embryogenese, Zelldifferenzierung und –proliferation oder den Zelltod (PEARSON et al., 2001). Nach dem heutigen Wissensstand sind vier Isoformen der p38 Mitogen -aktivierten Kinase (p38 MAPK) bekannt: p38 α (LEE et al., 1994), p38 β / β 2 (JIANG et al., 1996), p38 γ (LI et al., 1996) und p38 δ (JIANG et al., 1997). Die zwei Isoformen p38 α und p38 β / β 2 besitzen zu mehr als 70 % die gleichen Aminosäuren (JIANG et al., 1996), während es bei p38 γ und p38 δ nur ca. 60 % sind (LI et al., 1996; JIANG et al., 1997). P38 α wird neben p38 β ubiquitär exprimiert, während p38 β im speziellen im menschlichen Gehirn, im Herzen, in der Lunge, in der Leber, im Pankreas, in der Plazenta, in den Nieren und in den Skelettmuskeln vorkommt (JIANG et al., 1996). P38 γ findet sich überwiegend in den Skelettmuskeln (LI et al., 1996), während in Lunge, Nieren (JIANG et al., 1997), Hoden, Pankreas und im Dünndarm (KUMAR et al., 1997) p38 δ vorherrscht. P38 MAPKs werden aufgrund verschiedener zellulärer Stimuli wie DNA-Schäden, durch z.B. starke Sonneneinwirkung, Veränderungen der Osmolarität und des Metabolismus oder inflammatorischer Zytokine (wie IL-1 β , TNF- α , IL-6) (siehe Abbildung 2), aber auch aufgrund einiger Transkriptionsfaktoren wie Transkriptionsfaktor-Aktivator-Protein-1 und NF- κ B (siehe Abbildung 2) aktiviert (NOZAKI et al., 2001).

Phosphorylierung als Weg zur Aktivierung der MAPK

MAPKs werden in drei Familien unterteilt und zeichnen sich durch eine Aminosäure, die zwischen zwei phosphorylierten Resten in der sogenannten Aktivierungsschleife liegt, aus. Die extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen (ERKs) enthalten die Sequenz Threonin-Glutamin-Tyrosin, während die c-Jun-N-Terminalkinasen (JNKs), sowie die p38 MAPKinasen die Sequenzen Threonin-Prolin-Tyrosin, respektive Threonin-Glyzin-Tyrosin einbinden. Auf Aktivierung durch Phosphorylierung der Threonin und Tyrosin-Reste hin, werden wiederum wichtige intrazelluläre Enzyme und Transkriptionsfaktoren durch MAPK phosphoryliert (NOZAKI et al., 2001). Die Wirkungsmechanismen unterscheiden sich hierbei je nach dem Typus der Kinase. So resultiert die Phosphorylierung von p38 MAPK in einer Aktivierung des MAPK -aktivierenden Proteins 2 und des Aktivierungs-Transkriptionsfaktors 2 (ATF-2). Da JNK und p38 MAPK grundsätzlich durch die gleichen Stresssignale stimuliert werden, bezeichnet man sie auch als „Stresskinasen“, womit gleichzeitig eine Rolle dieser Kinasen in der Regulation der Zytokinfreisetzung und der Apoptose impliziert wird (NOZAKI et al., 2001). Sowohl MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) als auch Mitogen-Extrazelluläre-Signal-regulierenden Kinasen (MEK für Extrazelluläre-Signal-regulierende Kinasen 1 und 2) sind fähig, sowohl an der aliphatischen als auch der aromatischen Seitenketten die Proteine zu phosphorylieren, wobei die Substratspezifität der bekannten MAPK als sehr begrenzt gilt (PEARSON et al., 2001).

Aktivierung von p38 MAPK innerhalb der Inflammation

Inflammatorische Stimuli aktivieren Makrophagen, die eine intrazelluläre Signalweiterleitung einleiten, um dann die Produktion inflammatorischer Mediatoren zu veranlassen. Primäre inflammatorische Stimuli wie die Zytokine Il-1 β und TNF- α bewirken dann eine Antwort an den Toll-Rezeptoren, der Il-1 Rezeptor- (TIR) Familie, bzw. der TNF-Rezeptorfamilie. Diese Aktivierung der Rezeptoren setzt dann die MAPK-Kaskade in Kraft und aktiviert dadurch NF-kB (LEE et al., 1994; LEE und YOUNG, 1996; AGGARWAL, 2003). TNF- α ist ein potenter Aktivator von NF-kB, der wiederum ein potenter Stimulator von TNF- α ist (siehe Abbildung 2). Dieser positive Feedback stellt einen Schlüsselmechanismus bei chronischen Entzündungsvorgängen wie rheumatischer Arthritis und chronisch-entzündlicher Darmerkrankung („inflammatory bowel disease“) dar. Lipopolysaccharide (LPS), die einerseits Bestandteil der bakteriellen Zellmembran sind und andererseits via TLR4 als

Aktivator des Monozyten/Makro-phagensystems fungieren, stimulieren weiterhin MAPK, was dann in einer NF-kB-Aktivierung resultiert (KAMINSKA, 2005).

Eine Genexpression ist über drei verschiedene Hauptgruppen der MAP-Kinasen-Kaskaden reguliert. Dazu gehört ERK 1/2, JNK und p38 MAP-Kinase (KAMINSKA, 2005). Wie bereits erwähnt, wird der p38-Pfad durch Stress und pro-inflammatorische Zytokine, aber auch durch Wachstumsfaktoren in Gang gesetzt. Die Zellen reagieren dementsprechend über eine Stimulierung der Tyrosinkinasen (rezeptorabhängig oder rezeptorunabhängig), die wiederum „Guanidine exchange factor Proteine“ (GEF) aktivieren und somit auch zu einer Aktivierung des G-Proteins, sowie der MAPKK-Kinasen. Die Aktivierung der MAPKK-Kinasen führt zu einer Phosphorylierung, die eine Aktivierung der jeweiligen MAPK-Kinase (MKK3, 4 oder 6) einleitet (ZARUBIN und HAN, 2005). Auf die Aktivierung der MAP-Kinasen hin werden Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma oder Nukleus der Zelle präsentiert, darauf hin phosphoryliert und dadurch in einen aktiven Zustand gebracht. Dies führt dann über die Expression von Zielgenen zu einer biologischen Antwort (PEARSON et al., 2001).

2.3.4 Wiedererwärmungsmethoden und ihre Auswirkungen

Neurokognitive Dysfunktion ist eine häufige Komplikation nach Eingriffen am Herzen, die postoperativ mit erhöhter Morbidität (SHAW et al., 1987), eingeschränkter Lebensqualität (NEWMAN et al., 2001) und höheren perioperativen Kosten (ROACH et al., 1996) einhergeht. Verschiedene Untersuchungen zeigen eine verbesserte myokardiale und zerebrale Toleranz gegenüber Ischämie durch Hypothermie (BUCKBERG et al., 1977; GOVIER et al., 1984; BUSTO et al., 1989a; MARION et al., 1993). Mit entscheidend für den Einsatz von Hypothermie und ihren Erfolg ist die nachfolgende Wiedererwärmung, verbunden mit der Rate und Dauer dieser Wiedererwärmung. So kann die Wiedererwärmungsgeschwindigkeit die Sauerstoffsättigung der Vena jugularis interna (CHEN et al., 1996) nachteilig beeinflussen und neurokognitive Defizite nach sich ziehen (CROUGHWELL et al., 1994).

2.3.4.1 Temperaturmanagement

Eine wichtige Rolle während Eingriffen am Herzen spielt die Temperaturmessung (STONE et al., 1995). Denn die zerebrale Temperatur ist eine kritische, für die postoperative Phase entscheidende, und auch nicht von außen erkennbare Größe. Sowohl rektale Temperatur als auch die der Blase lassen nur wenige Rückschlüsse auf die Gehirntemperatur zu und sollten in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden (COSELLI und LEMAIRE, 2002). Wiedergegeben wird die zerebrale Temperatur eher durch die tympanische, ösophageale und nasopharyngeale Temperaturmessung. Aus praktikablen Gründen wird aber die Vena jugularis interna zur Überwachung der Gehirntemperatur favorisiert. Obwohl man keine konkreten klinischen Empfehlungen für einen Einsatz von postoperativer Hypothermie geben kann, so gibt es deutliche Hinweise, die es sinnvoll erscheinen lassen Hyperthermie zu vermeiden (DIETRICH et al., 1990; SHUM-TIM et al., 1998; COOK, 2001). Hyperthermie kann im Kontext der zerebralen Ischämie sogar die Entstehung von Nekrosen beschleunigen, was in einer größeren Infarktzone und in einem postoperativ schlechteren neurologischen Ergebnis resultiert (COSELLI und LEMAIRE, 2002). Um eine erfolgreiche Temperaturmessung vornehmen zu können, sollte nasopharyngeal oder tympanisch ein Zugang über die Vena jugularis interna geschaffen werden. Mit der Wiedererwärmung sollte so früh wie möglich begonnen werden und die Wiedererwärmungsrate sollte konstant bei weniger als 0,5 °C/min gehalten werden. Falls es möglich sein sollte, ist der Wärmeaustauscher auf oder unter einer Temperatur von 38 °C zu stellen. Sowohl die Perfusat- als auch die Patiententemperatur sollte die 37 °C nicht überschreiten. Der Temperaturgradient zwischen Perfusat und Patient sollte unter 10 °C gehalten werden. Zuletzt sollte bei Erreichen einer Temperatur von 36,5 °C die Wiedererwärmung beendet werden, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden. Um den nach EKZ gelegentlich auftretenden „Afterdrop“ nicht eintreten zu lassen, bei dem Patienten die Intensivstation mit Körpertemperaturen von 34 bis 35 °C erreichen, sollte man mit warmen Luftmänteln die langsame Wiedererwärmungsphase verlängern. Bei einem „Afterdrop“ handelt es sich um einen sogenannten Rückschlag- oder Reboundeffekt der Hypothermie, d.h. einem stark ausgeprägten Abfallen der Kerntemperatur nach der EKZ. Dieser entsteht aus einer inadäquaten Umverteilung der Körperwärme in periphere Körperregionen (RAJEK et al., 2000). Diese Umverteilung prädisponiert den Patienten zu einem Schüttelfrostinduzierten erhöhten Sauerstoffverbrauch, Arrhythmien und einem Anstieg des peripheren vaskulären Widerstands

(CALDWELL et al., 1981). Dabei sollte darauf geachtet werden, dass eine Patiententemperatur von 37 °C nicht überschritten wird. Während der frühen postoperativen Phase sollte jedes milde Fieber ($> 37,8$ °C) aggressiv mit Antipyretika, besonders bei Patienten mit neurologischen Defiziten, behandelt werden.

2.3.4.2 Wiedererwärmungsrate

Obwohl Hypothermie v.a. während EKZ die myokardiale und zerebrale Toleranz gegenüber Ischämie verbessert (BUCKBERG et al., 1977; GOVIER et al., 1984; BUSTO et al., 1989a; MARION et al., 1993), erfordert sie nach EKZ eine Wiedererwärmung zu normothermen Temperaturen. Dabei sind sowohl die Rate und die Dauer der Wiedererwärmung abhängig vom Ausmaß der Hypothermie. Die Wiedererwärmungsgeschwindigkeit steht dabei in direkter Relation zur Sauerstoffentsättigung der Vena jugularis interna und damit in direkter Verbindung zum neurologischen Outcome (CROUGHWELL et al., 1994). In einer prospektiven Studie von GRIGORE und Kollegen (2002) wurden 165 Patienten einer Bypass-Operation unterzogen. Dabei teilte man 100 Patienten der Gruppe zu, die in einer konventionellen Art erwärmt wurden (4 bis 6 °C Gradient zwischen nasopharyngealer und EKZ-Perfusat-Temperatur) und 65 Patienten einer Langsamen Wiedererwärmungsgruppe (nie mehr als 2 °C Differenz zwischen nasopharyngealer und EKZ-Perfusat-Temperatur). Die Untersuchungen zeigen, dass eine langsamere Wiedererwärmungsrate, verbunden mit insgesamt niedrigeren Höchsttemperaturen zu einem signifikant besseren kognitiven Ergebnis führt (GRIGORE et al., 2002). Lediglich Patienten aus der Gruppe der langsamen Wiedererwärmung, die an Diabetes erkrankt waren, wiesen geringfügig schlechtere kognitive Leistungen auf. Den neuroprotektiven Effekt auf die ansonsten gesunden Patienten erklären sich die Untersucher mit einer Verbesserung des Verhältnisses von zerebralem Blutfluss zur zerebralen metabolischen Sauerstoffrate und einer erniedrigten Inzidenz postoperativer Hyperthermie. BAR-YOSEF und Kollegen (2004) demonstrieren ebenfalls, dass eine Begrenzung der Endtemperatur während der Erwärmung eine zerebrale Hyperthermie verhindern kann. Zugleich lässt sich eine verlängerte postoperative Hypothermie vermeiden, indem eine limitierte Wiedererwärmung mit kontinuierlicher Oberflächenerwärmung kombiniert wird (BAR-YOSEF et al., 2004). Die schädlichen Effekte der Hyperthermie werden besonders deutlich, wenn man den Randbereich des eigentlichen Infarkts, die sog. „Penumbra“ betrachtet (OLSEN et al., 1983). Als Penumbra (lat. Halbschatten) bezeichnet man den Bereich, der sich im Falle eines Hirninfarkts direkt an die zentrale Nekrosezone

anschließt und noch überlebensfähige Zellen enthält. Dieses Gebiet gilt als sehr empfindlich gegenüber zusätzlichen Einflüssen (OLSEN et al., 1983). So führt ein Anstieg der Temperatur zu einer erhöhten metabolischen Rate, die potentiell eine Verschlechterung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen Sauerstoffversorgung und Bedarf in der ischämischen Penumbra nach sich zieht. Gleichzeitig bewirkt die Hyperthermie u.a. die Freisetzung toxischer exzitatorischer Neurotransmitter, einen Anstieg freier Sauerstoffradikale, Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und des Zytoskeletts und führt zu einem Anstieg der ischämischen Depolarisationen und der neuronalen intrazellulären Laktatazidose (GINSBERG und BUSTO, 1998).

2.3.4.3 Zusammenhang von Sauerstoffsättigung und Temperatur

Eine deutliche Entsättigung des jugulären venösen Hämoglobins während der Wiedererwärmung steht in Zusammenhang mit einem ungünstigen postoperativen neuropsychologischen Ergebnis und kann Zeichen eines pathologischen Verhältnisses zwischen zerebralem Blutfluss und zerebraler metabolischer Sauerstoffrate sein. Eine Reduktion der allgemeinen zerebralen Sauerstoffversorgung während der EKZ ist mit einer diffusen neuropsychologischen Schädigung verbunden. Verschiedene Forschungsgruppen liefern Beweise dafür, dass eine solche Periode tatsächlich während der EKZ existiert. Sie beobachteten, dass vor allem während der Wiedererwärmung die juguläre venöse Hämoglobinsättigung abfällt (VAN DER LINDEN et al., 1989; CROUGHWELL et al., 1992; CROUGHWELL et al., 1994). CROUGHWELL et al. (1994) und NEWMAN et al. (1994) konnten eine Assoziation zwischen der Größenordnung der während der Wiedererwärmung auftretenden jugulären venösen Hämoglobinsättigung und der Schwere der postoperativen neuropsychologischen Dysfunktion feststellen. Dies deutet wiederum darauf, dass eine venöse Hämoglobinsättigung als Indikator für ein bestehendes, klinisch signifikantes Missverhältnis zwischen zerebralem Sauerstoffverbrauch und -abgabe während der Wiedererwärmungsphase steht. Weiterhin beobachtete man, dass die Sauerstoffentsättigung mit steigender Wiedererwärmungsrate ansteigt (VAN DER LINDEN et al., 1989). Es gibt zwei Möglichkeiten diesen Zusammenhang zu erklären: eine schnellere Wiedererwärmung resultiert in einer höheren zerebralen metabolischen Sauerstoffrate, wobei aber der zerebrale Blutfluss unverändert bleibt. Oder eine schnellere Wiedererwärmung führt zu einem geringeren zerebralen Blutfluss, aber die zerebrale metabolische Sauerstoffrate verändert sich nicht (ENOMOTO et al., 1996).

Zwischen dem zerebralen Blutfluss und der metabolischen Rate besteht ein proportionaler Zusammenhang. Dieses Phänomen wird auch als Fluss-Metabolismus-Kopplung bezeichnet. Es wird vermutet, dass als Antwort auf einen Anstieg des neuronalen Metabolismus verschiedene Mediatoren wie Stickoxid, Adenosin oder Kalium von Neuronen, Gliazellen und/oder von perivaskulären Nerven freigesetzt werden. Diese Mediatoren führen zu einer Relaxation der glatten Muskulatur, was wiederum zu einem Anstieg des zerebralen Blutflusses proportional zum Anstieg des neuronalen Metabolismus führt.

Mit einem mathematischen Modell für den Sauerstofftransfer vom Blut zum Gehirn konnte gezeigt werden, dass der Sauerstofftransport stark von der Sauerstoffaffinität zu Hämoglobin abhängt (DEXTER und HINDMAN, 1995). Durch eine Kühlung des Blutes ist als Resultat auf eine ansteigende Hämoglobin-Sauerstoffaffinität (gesunkenes Hämoglobin P_{50}) der Sauerstofftransport von Hämoglobin zum Gehirn stufenweise beeinträchtigt. Daraus folgt, dass der Sauerstofftransfer von Hämoglobin zum Gehirn bei warmem Blut mit herabgesetzter Sauerstoffaffinität (ansteigendes P_{50}) erleichtert sein sollte. Dies ist am besten feststellbar bei warmen Blut und kaltem Gehirn. In dieser Situation führt eine verbesserte Überführung des Sauerstoffs im Gehirn zu einem Absinken des Sauerstoffs in den zerebralen venösen Gefäßen (d.h. ein höherer Grad der Entsättigung). In der schnellen Wiedererwärmungsgruppe konnte in weniger als vier Minuten nach Beginn der Wiedererwärmung das Blut der Aorta auf normotherme Temperaturen gebracht werden. Obwohl die zerebrale metabolische Rate für Sauerstoff bei schnellerer Wiedererwärmung steigt, nehmen ENOMOTO et al. (1996) an, dass durch einen Anstieg des Hämoglobin P_{50} eine Verbesserung des Sauerstofftransports des Hämoglobins aus dem Blut zum Gehirn erreicht wird (d.h. ansteigende zerebrale Sauerstoffentnahme). Folglich kann so ein erhöhter Sauerstoffbedarf des Gehirns ohne eine Erhöhung des zerebralen Blutflusses gedeckt werden, während gleichzeitig eine geringere zerebrale metabolische Rate (aber mit kälterem Blut) vorliegt. Deshalb könnte eine stärkere Entsättigung des venösen jugulären Blutes in der schnellen Wiedererwärmungsgruppe für einen erleichterten Sauerstofftransfer sprechen. In diesem Fall liegt kein pathologisches Missverhältnisses von Blutfluss zu Metabolismus vor. Das bedeutet weiterhin, dass der zerebrale Blutfluss nicht proportional zur zerebralen metabolischen Sauerstoffrate ansteigen muss (ENOMOTO et al., 1996).

Dies würde entgegen der gängigen Ansichten dafür sprechen, dass eine Entsättigung des zerebralen venösen Hämoglobins nicht zwingend Zeichen einer verringerten zerebralen Sauerstoffanreicherung (oder eines Missverhältnisses von Blutfluss und Metabolismus) sein

muss. Stattdessen könnte es ein Effekt der wechselnden Bluttemperatur auf die zerebrale metabolische Sauerstoffrate und dem Sauerstofftransfer aus dem Blut ins Gehirn sein. Geht man davon aus, dass eine wiedererwärmungsbedingte Entsättigung mit diesem Mechanismus direkt zusammenhängt, sollte eine zerebrale venöse Hämoglobinentsättigung nicht mit neuropsychologischen Schäden verbunden sein, wie es aber durch CROUGHWELL und Kollegen (1994), sowie NEWMAN und Kollegen (1994) postuliert wurde. Interessanterweise konnten die Patienten mit dem größten Grad der Wärme-induzierten Entsättigung des Hämoglobins bereits vor dem Beginn der Wiedererwärmung identifiziert werden (CROUGHWELL et al., 1994; NEWMAN et al., 1994). Patienten, die durch eine größere Hämoglobinentsättigung während der Wiedererwärmungsphase auffielen, zeigten einen geringeren zerebralen Blutfluss, eine größere zerebrale metabolische Sauerstoffrate und eine größere Sauerstoffentsättigung während hypothermer EKZ, als Patienten ohne Auftreten von venöser Hämoglobin-entsättigung (CROUGHWELL et al., 1994; NEWMAN et al., 1994). Dieser Umstand lässt vermuten, dass Patienten mit dem größten Entsättigungsgrad bereits vor dem Eingriff zerebro-vaskuläre Probleme hatten (CROUGHWELL et al., 1990). Somit könnte eine Steigerung neuropsychologischer Schädigungen mit gleichzeitigem Auftreten zerebraler venöser Entsättigung des Hämoglobins durch eine abnormale Fluss-Metabolismus-Kopplung und/oder einer Gehirnverletzung hervorgerufen sein, die bereits vor der EKZ vorlag. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in den Studien von CROUGHWELL et al. (1994) und NEWMAN et al. (1994) die Wärmebedingte, juguläre venöse Hämoglobinentsättigung als ein Marker für präoperative Gehirnverletzungen und somit auch als Auslöser postoperativ auftretender neuropsychologischer Beeinträchtigungen zu sehen ist. Somit kann die Beeinflussung der Hämoglobinsättigung durch die Veränderung der Wiedererwärmungsrate oder durch pharmakologische Intervention durch Reduktion der zerebralen metabolischen Rate keine eindeutigen Hinweise auf das postoperative, neuropsychologische Ergebnis liefern.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielvorstellung

In vorangehenden Studien im eigenen Labor konnte ein Modell der EKZ mit DHCA an der Ratte entwickelt werden, das ein Überleben des Tieres möglich macht (JUNGWIRTH et al., 2006). Damit konnte bereits die zerebrale und systemische Inflammation 28 Tage nach EKZ nachgewiesen werden (KELLERMANN et al., 2006). In der vorliegenden Studie sollen nun die Tiere nach einer DHCA-Dauer von 45 min entweder langsam (40 min) oder schnell (20 bis 22 min) auf eine rektale Temperatur von 35,5 °C wiedererwärmt werden. Es soll so anhand des kliniknahen Modells des tief hypothermen Kreislaufstillstandes eine etwaige zerebrale Inflammation nach 24 h mit unterschiedlichen Wiedererwärmungsgeschwindigkeiten, die bei der Entwicklung postoperativer neurologischer Schädigungen eine Rolle spielt, untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

haben die Wiedererwärmungsrate, sowie die Dauer der Wiedererwärmung einen Einfluss auf die zerebrale und systemische Inflammation (histologische und immunhistochemische Untersuchung, sowie Western Blot)

welchen Einfluss haben die Wiedererwärmungsrate, sowie die Dauer der Wiedererwärmung auf die neurologische Funktion (Neurologische Untersuchung),

und sind sowohl die möglichen inflammatorischen Pathomechanismen als auch die neurologischen Defizite mit histologischen Veränderungen verbunden.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG i. d. F. vom 25.05. 1998, BGBl I S. 1105 zuletzt geändert am 06.08. 2002, BGBl I S. 3082) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Tiere, Material und Methodik

3.2.1 Versuchstiere

Es werden 30 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 10 bis 12 Wochen und Gewichten zwischen 330 und 390 g verwendet. Diese werden vor dem eigentlichen Versuchsbeginn für einen Zeitraum von zwei Wochen in Gruppen von maximal drei Tieren in Makrolon Käfigen Typ IV untergebracht. Dieser Zeitraum dient zur Akklimation an den veränderten Tag-Nacht-Rhythmus. Danach folgt eine weitere Woche in einer Versuchsbox (graues, undurchsichtiges PVC, Weiss, München) mit den Maßen 80 x 60 x 50 cm. Den Tieren stehen Wasser und Futter (Altromin1324, Altromin GmbH, Lage-Lippe) über Nippeltränken und Futterraufen immer *ad libitum* zur Verfügung. Der Wasserwechsel erfolgt täglich.

Als Einstreu dient entstaubtes, entkeimtes Weichholzgranulat (AltrominFaser, Altromin GmbH, Lage-Lippe), welchem zusätzlich Heu und eine Lage Zellstoff zugefügt wird. Jeden zweiten Tag wird die gesamte Einstreu ausgewechselt.

Die Haltungsbedingungen entsprechen den Standard-Labor-Konditionen: der Tag/Nacht-rhythmus entspricht 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit, wobei ab 0:00 Uhr das Licht automatisch über eine Zeitschaltuhr eingeschaltet und nach zwölf Stunden, parallel mit einem Radio als Geräuschquelle wieder ausgeschaltet wird. Die Lichtintensität beträgt durchschnittlich 60 Lux, gemäß den Richtlinien für albinotische Tiere (GV-SOLAS, 1988). Durch das Radio sollen sich die Tiere an Stimmen während der Hellphase gewöhnen. Die relative Luftfeuchte liegt bei $60 \pm 15 \%$ und die Raumtemperatur bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.2 Versuchsplan

Der Versuch gliedert sich in die operative Phase, sowie in die prä- als auch postoperative Untersuchung der neurologischen Funktion. Während der OP werden die Ratten an die extrakorporale Zirkulation (EKZ) angeschlossen und für 45 min einem tief hypothermen Kreislaufstillstand (DHCA) unterzogen. Anschließend werden sie entweder schnell (innerhalb von 20 min.) oder langsam (innerhalb von 40 min.) wiedererwärmt. Die Tiere sind hierfür je nach Wiedererwärmungsmethode in zwei Untersuchungsgruppen eingeteilt. Als Kontrolle dient eine Gruppe nicht operierter Tiere. Sowohl an den präoperativen Tagen -2, -1, als auch am ersten Tag nach der Operation werden alle Tiere neurologisch untersucht.

Am Tag 1, 24 Stunden nach Beendigung der EKZ werden die Ratten nach der neurologischen Untersuchung in tiefer Isoflurannarkose getötet und das Gehirn für die histologische, sowie molekularbiologische Untersuchung entnommen.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung und -größe

Gruppeneinteilung	Gruppengröße
langsame Wiedererwärmung	10
schnelle Wiedererwärmung	10
Nativtiere	10

3.2.2.1 Chirurgische Präparation

Anästhesie während der Präparation

Vor Einleitung der Anästhesie werden die Tiere einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, um die Gesundheit der Tiere sicher zu stellen und damit zu gewährleisten, dass der Eingriff nur an gesunden Ratten durchgeführt wird. Die nicht nüchternen Tiere werden in eine hierfür vorgesehene Narkosebox aus Plexiglas gesetzt in der sie 5,0 Vol % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in 95 Vol % Sauerstoff atmen. Nach Verlust des Bewusstseins und der Stellreflexe intubiert man die Ratten endotracheal. Dies geschieht mit Hilfe eines modifizierten Nasenspekulums mit integrierter Fiberglasoptik, sowie einer Taschenlampe zur Sichthilfe. Ein Venenverweilkatheter (14 GA, Venflon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) dient dabei als Tubus. Danach wird das Tier umgehend über ein Kleintierbeatmungsgerät mit 2 bis 2,5 Vol % Isofluran in ca. 40 % Sauerstoff, sowie 57,5 % Luft und mit einer Frequenz von 50 bis 60/min und einem max. Atemdruck von 11 bis 15 mmHg beatmet. Das halboffene System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 0,8 l/min, Gasabsaugung und einen vorgeschalteten Präzisionsverdampfer (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden). Analgetisch wird repetitiv ein 5 µg Bolus Fentanyl (Janssen-Cilag GmbH, Neuss) verabreicht, um einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 70 bis 90 mmHg zu sichern. Um die Cornea vor Austrocknung zu schützen, wird eine Augensalbe (Bepanten® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) appliziert, während die Maulschleimhaut mit einem mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer geschützt wird.

Präparation und Kanülierung

Sämtliche Präparationsgebiete (rechte Hals-, Brust- und Leistengegend) werden gemäß den aseptischen Kautelen der Chirurgie zuerst geschoren, dann mit einem Hautdesinfektionsmittel (Cutasept® F, Fa. Bode, Hamburg) besprüht und lokal mit Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2 %, Astra Zeneca, Großbritannien) anästhesiert. Die Schwanzgegend wird nicht geschoren, aber wie bereits beschrieben desinfiziert und anästhesiert.

Für die Präparation der Gefäßzugänge (Schwanzarterie, Arteria epigastrica superficialis der rechten Leistengegend, Vena jugularis externa) wird die Haut inzidiert, das subkutane

Fettgewebe stumpf durchtrennt, die zugehörige Arterie, respektive Vene und Nerv, sowie umgebendes Bindegewebe vorsichtig gelöst und das zu kanülierende Gefäß isoliert dargestellt. Damit der später eingeführte Katheter fest fixiert werden kann, wird das Gefäß distal ligiert (4-0 PH-Seide, Ethicon®, GmbH, Norderstedt) und proximal durch eine Ligatur lose umschlungen. Damit das Gefäß dilatiert und dadurch besser darstellbar wird, benetzt man dieses mit Lidocainhydrochlorid. Nun wird die Gefäßwand mit einer mikrochirurgischen Schere inzidiert und der mit heparinisierte Vollelektrolytlösung (Thomaejoninlösung®, Delta Select GmbH, Pfullingen) gefüllte Katheter vorsichtig in das jeweilige Gefäß eingeführt.

Auf der Ventralseite des Schwanzes wird die Schwanzarterie (A. sacralis mediana) über einen medianen Zugang mit einem Venenverweilkatheter (20 GA, Insyte-W™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kanüliert, welcher während der EKZ als arterielle Zuflusskanüle dient. Die Wahl der A. sacralis mediana begründet sich auf dem flachen Eintrittswinkel in die Aorta abdominalis, wodurch sie den Blutfluss während der EKZ sichert. Anschließend wird das Tier vollheparinisiert, was einer Menge von 150 I.E. Heparin Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) bei der Ratte entspricht. Aus diesem Grund findet die Blutstillung besondere Beachtung.

Um die invasive Blutdruckmessung während der EKZ zu sichern, wird über eine Inzision in der rechten Inguinalgegend ein angespitzter Polyethylen-Katheter (PE 10, Intramedic™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in die A. epigastrica superficialis dexter eingeführt.

Im Sulcus jugularis zwischen dem M. brachiocephalicus und dem M. sternooccipitalis liegt die V. jugularis externa dextra, welche paramedian über einen Zugang in der rechten caudoventralen Halsseite erreicht wird. Ein großlumiger 4,5 Fr Katheter (eigene Herstellung) mit mehreren Stanzlöchern gewährleistet die venöse Drainage während der EKZ, indem er bis in den rechten Vorhof geschoben auch die Drainage der V. cava caudalis und der V. cava cranialis sinistra und dextra, welche regelmäßig bei Ratten vorkommen, erlaubt.

Der Katheter wird anschließend durch die vorgelegte Ligatur um Katheter und Gefäßwand gesichert und die Wundränder mit einem Heft (4-0 Prolene™, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Um das Wundgebiet feucht zu halten, wird das Operationsfeld von einem mit physiologischer Kochsalzlösung getränktem Tupfer bedeckt.

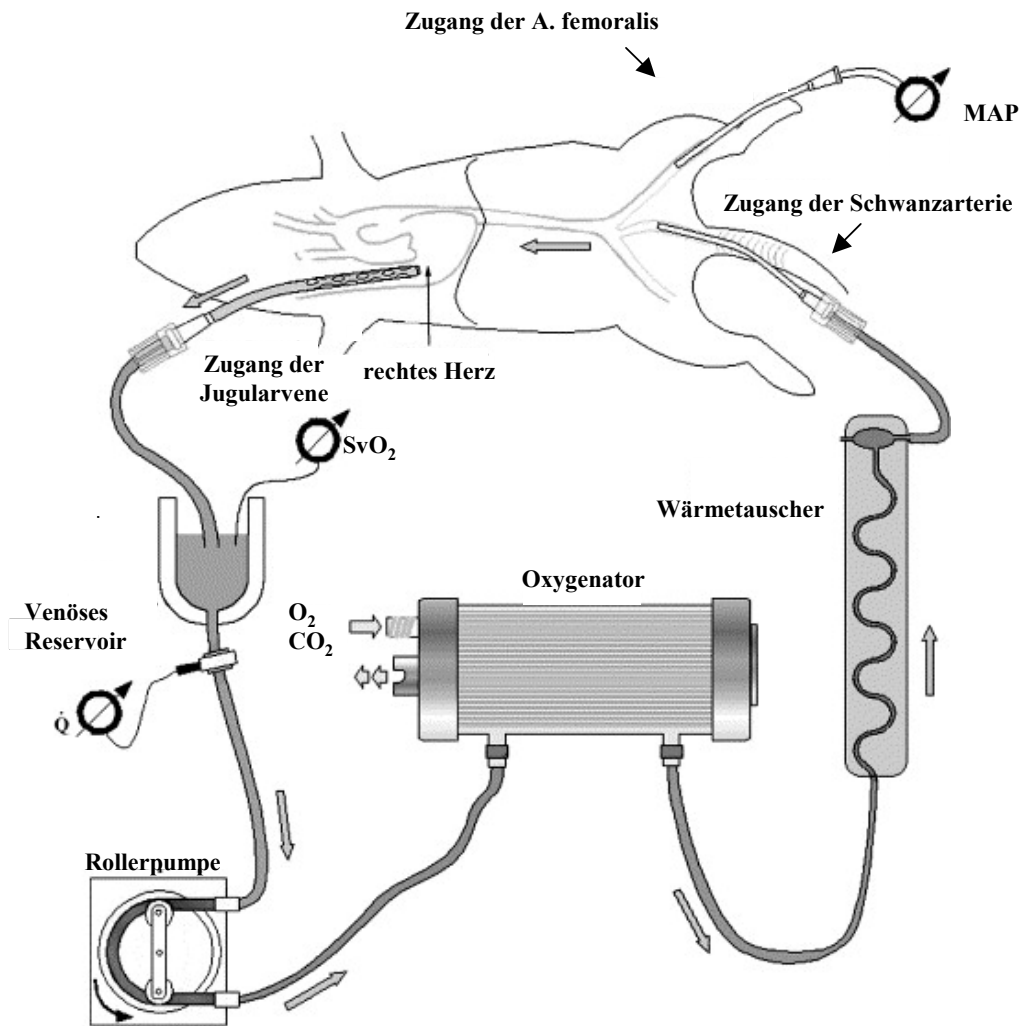


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Präparation der Ratte, modifiziert nach DIELEMAN et al., 2006.

3.2.2.2 Extrakorporale Zirkulation

Anästhesie während der Extrakorporalen Zirkulation (EKZ)

Während der Abkühlungsphase wird die Anästhesie durch Isofluran (0,8 bis 1 Vol %) aufrechterhalten. Um eine Analgesie zu gewährleisten, erhalten die Tiere repetitiv Fentanyl (5 µg Boli) und zur Relaxation 1,6 mg/h Cisatracurium (Nimbex®, GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München). Ein positiver endexpiratorischer Druck (5 cmH₂O) mit einem FiO₂ = 0,21 wird durch einen kontinuierlichen positiven Atemwegsdruck (CPAP) während der Beatmung erreicht, um einer Atelektasenbildung in der Lunge vorzubeugen.

Der arterielle Blutdruck, die rektale und perikranielle Temperatur, die Blutgase (temperaturkorrigiert, pH-stat), als auch die Blutglucose werden wiederholt gemessen und aufgezeichnet. Zusätzlich werden Serumproben zehn Minuten vor Beginn der EKZ, kurz vor dem DHCA, am Ende der Aufwärmungsphase und eine Stunde nach Beendigung der Extrakorporalen Zirkulation genommen.

Abkühlungsphase mit Extrakorporaler Zirkulation

Die Herz-Lungen-Maschine besteht aus vier Komponenten: dem venösen Reservoir (Plexiglas®, Dipl. Ing. M. Humbs, Valley), der Rollerpumpe (Masterflex®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois), dem speziell für Ratten entwickelten Membranoxygenator mit integriertem Wärmetauscher und dem im arteriellen Schenkel zwischengeschalteten Flowmeter (T208 volume flowmeter, Transonic Systems Inc., Ithaca). Letzteres gewährleistet die kontinuierliche Messung des erreichten Blutflusses. Der speziell für Ratten entwickelte Membranoxygenator (Füllungs-Volumen 4 ml) besteht aus zwei Plexiglasplatten (12,8 x 12,8 x 2,7 cm), die von einer Diffusionsmembran (Hohlfasermembran, Jostra AG, Hirrlingen) umgeben ist. Diese Membran ist kreuzweise dreischichtig aufgebaut, wodurch sie die Oxygenierung des Blutes ermöglicht. Durch diese Bauweise wird eine Gasaustauschfläche von 558 cm² erreicht. Die einzelnen Bestandteile der HLM sind durch Silikonschläuche (Innendurchmesser = 1,6 mm, Tygon®, Cole-Parmer Instrument Co., USA) miteinander verbunden. Zunächst gelangt das venöse Blut aus dem rechten Vorhof über Schwerkraftdrainage in das venöse Reservoir. Die Rollerpumpe pumpt dann das Blut in den Oxygenator, wo es über die Diffusionsmembran mit den notwendigen Narkosegasen und

Sauerstoff angereichert wird. Über die arterielle Zuflusskanüle gelangt das Blut dann wieder in den Körperkreislauf der Ratte.

Zu Beginn der EKZ wird der HLM-Kreislauf mit zehn ml 6 %iger Hydroxyethylstärke (HES, Voluven®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) gefüllt, was in der gängigen Literatur auch als „priming“ bezeichnet wird und benötigtes Spenderblut einsparen kann. Initial beträgt der HLM-Fluss 160 bis 180 ml/kg/min und wird sukzessive um die Hälfte während der Abkühlungsphase gesenkt. Die Tiere werden während der 30-minütigen Abkühlungsphase auf eine rektale Temperatur von 15 bis 18 °C durch indirekte Kühlung mit Hilfe von Eisbeuteln und einer temperaturgesteuerten Wärme- bzw. Kühlmatte gebracht. Gleichzeitig bedient man sich der Methode der direkten Kühlung, erfüllt durch die Wärmetauscherfunktion des Oxygenators. Hierbei wird das vorbeiströmende Blut lediglich durch eine dünne Plexiglasschicht vom temperaturgesteuerten Wasserbad (Polystat Control cc2, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) getrennt und somit im Gegenstromaustauscherprinzip die Temperaturgradienten ausgeglichen. Zu diesem Zeitpunkt wird die Rollerpumpe abgeschaltet und das venöse Blut in das Reservoir abgeleitet.

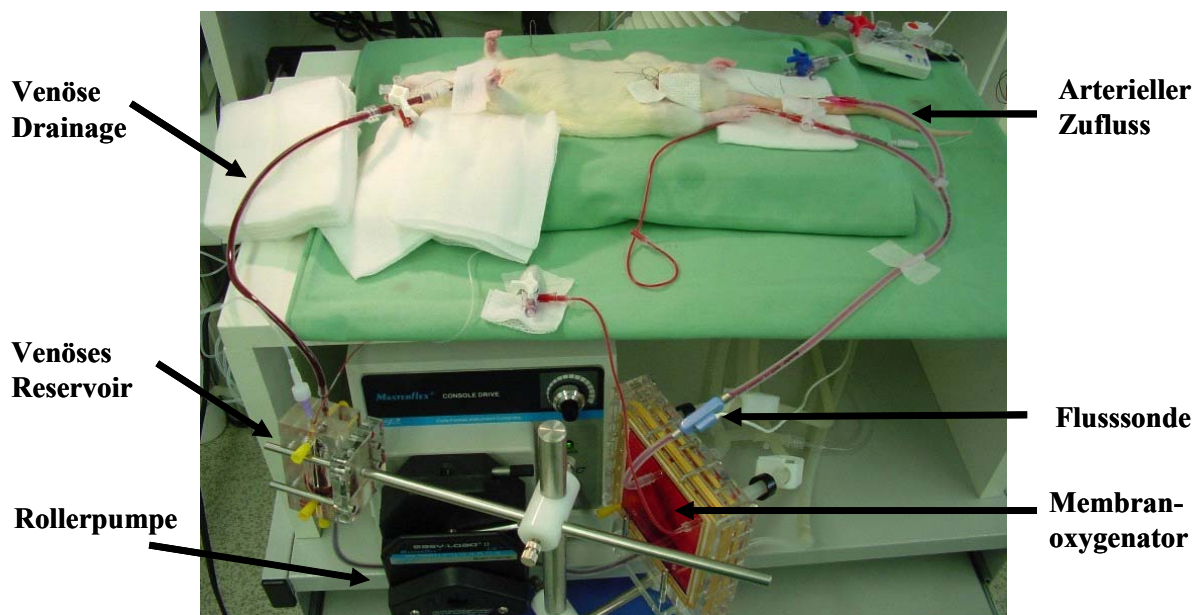


Abbildung 6: Aufbau der Extrakorporalen Zirkulation.

3.2.2.3 Tief Hypothermer Kreislaufstillstand (DHCA)

Mit Erreichen einer Körpertemperatur zwischen 15 bis 18 °C zum Ende der Abkühlungsphase, wird die HLM abgeschaltet und das Tier bei geschlossener, arterieller Zuflusskanüle und geöffneter venöser Drainage entblutet. Somit wird eine Dilatation des ansonsten blutgefüllten Herzens während des Kreislaufstillstandes vermieden. Die stark verlangsamte Herzfrequenz sistiert bei den niedrigen Temperaturen und erfordert keinerlei kardioplege Substanzen. Der DHCA ist gekennzeichnet durch Asystolie, sowie einem MAP von null und wird für 45 Minuten bei 15 bis 18 °C beibehalten.

Anästhesie während des tief hypothermen Kreislaufstillstandes

Während des hypothermen Kreislaufstillstandes werden die Anästhesie und auch die Beatmung vollständig eingestellt.

3.2.2.4 Reperfusion und Wiedererwärmung mit EKZ

Anästhesie während der Wiedererwärmungsphase

Die Anästhesie innerhalb der Reperfusions- und Wiedererwärmungsphase wird entsprechend der Abkühlungsphase vor dem tief hypothermen Kreislaufstillstand (siehe 3.2.2) mit 0,8 bis 1,0 Vol % Isofluran in 100 % Sauerstoff, 5 µg Boli Fentanyl und 1,6 mg/h Cisatracurium fortgeführt. Nach vorherigem Kammerflimmern und Kammerflattern beginnt das Herz durch steigende Temperaturen ohne jegliche medikamentöse Behandlung wieder an zu schlagen und erreicht nach anfänglichen Ersatzrhythmen mit breiten QRS-Komplexen wieder den ursprünglichen Sinusrhythmus. Sobald eine periphere Körpertemperatur von über 30 °C erreicht ist, erhält das Tier repetitiv 20 µg/ml Norepinephrinhydrochlorid (Aterenol® 1ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um den MAP bei über 50 mmHg zu halten. Im Falle von hypoglycämischen Zuständen (Blutglucose < 80 mg/dl) werden 0,1 bis 0,2 ml einer 50 %igen Glucose-Lösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) titriert verabreicht. Kommt es zu azidotischen Verschiebungen, so werden diese mit Natriumhydrogencarbonat 84 mg/ml (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) nach der Formel Bicarbonat = $-BE \times 0,3 \times \text{kg KGW}$ ausgeglichen. Um einen Calciumabfall auf Konzentrationen unter 1 mmol/l zu verhindern, wird Calcium substituiert.

Dies geschieht durch die Zugabe von 0,1 ml Boli einer 10 %igen Calciumgluconat-Lösung (Calcium Braun 10 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) unter Kontrolle der Blutelektrolyte.

Auf die Zugabe von Heparinantagonisten, wie z.B. Protamin, zum Abklingen der antikoagulatorischen Eigenschaften der Vollheparinisierung wird verzichtet.

Reperfusion und Wiedererwärmung

Nachdem 100 I.E. Heparin in den HLM-Kreislauf zugeführt werden, schließt man das Tier bei einer rektalen Temperatur von 15 bis 18 °C und einer Flussrate von 105 ml/kg/min wieder an die HLM an. Die Zustromrate wird graduell erhöht, so dass bei 30 °C 120 ml/kg/min und gegen Ende der Erwärmungsphase eine Flussrate von 160 bis 180 ml/kg/min erreicht werden. Je nach Wiedererwärmungsmethode variiert diese Vorgehensweise, wie folgt.

Im Rahmen der **langsamen Wiedererwärmung** über 40 Minuten beginnt man bei einer Flussrate von 105 ml/kg/min das Tier sukzessive zu erwärmen, indem sowohl die Wärmematte als auch der Wärmetauscher des Oxygenators auf eine Temperatur von 38,5 °C gebracht werden. Dies geschieht langsam über einen Zeitraum von 40 Minuten, wobei die Temperatur in den ersten 20 Minuten um 1 °C/min erhöht wird. Danach sinkt die Wiedererwärmungsgeschwindigkeit um 0,5 °C/min in den darauf folgenden 10 Minuten und erreicht ihren Tiefpunkt gegen Ende der Wiedererwärmungsphase, mit einer Geschwindigkeit von 0,1 °C/min. Bereits acht Minuten nach Beginn der Wiedererwärmung liegt die Temperatur des Wärmetauschers bei 38,5°C. In der Schlussphase beträgt die gemessene rektale Temperatur 35,5 °C.

Das Verfahren der **schnellen Wiedererwärmung** über 20 Minuten sieht ebenfalls eine Einstellung der Wärmematte auf eine Temperatur von 38,5 °C vor, allerdings wird hierbei zusätzlich der Wärmetauscher des Oxygenators auf 60 °C justiert. Dies führt zu einer schnelleren Bluterwärmung, die allerdings nie die 40 °C Grenze überschreitet. Gleichzeitig wird darauf geachtet, dass die Temperaturerhöhung nie 1 °C/min innerhalb von 20 Minuten übersteigt. Die rektale Temperatur beträgt auch bei dieser Methode gegen Ende 35,5 °C.

Beiden Verfahren gleich sind eine volle Flussrate von 160 bis 180 ml/kg/min nach Abschluss des verschiedenen Wiedererwärmungsprocedures und der darauffolgende Abgang von der Herz-Lungen-Maschine.

3.2.2.5 Abgang von Extrakorporaler Zirkulation und Nachbeatmung

Nach Abschluss der Wiedererwärmungsphase wird sowohl der arterielle als auch der venöse Zufluss unterbrochen und somit die Verbindung des Tieres zur HLM unterbunden. Die Nachbeobachtung erstreckt sich über eine Stunde, in welcher die physiologische Homöostase wieder hergestellt wird. Innerhalb dieser Phase wird Blut aus dem zirkulierenden Kreislauf entnommen, dann zentrifugiert (2000 RPM/10 min) und der Überstand abpipettiert, um dann das zurückbleibende Erythrozytenkonzentrat mit HES auf einen Hämatokrit von 50 % verdünnt, langsam über die Schwanzarterie zu retransfundieren.

Anästhesie während der Nachbeatmungsphase

Nach Diskonnektion von der HLM bleiben die Tiere noch für eine weitere Stunde anästhesiert (1,0 bis 1,5 % Isofluran), intubiert und kontrolliert beatmet. Die Rektaltemperatur wird auf 36,5 °C eingestellt. Beziehend auf die Blutgas- und Elektrolytuntersuchungen wird den Tieren wie bereits oben beschrieben Natriumhydrogencarbonat und Calciumgluconat verabreicht. Die letzte Blutgasanalyse erfolgt nach der einstündigen Nachbeobachtung und bevor die Katheter entfernt werden.

Danach werden die Katheter der V. jugularis externa, A. epigastrica superficialis und der Schwanzarterie entfernt, die Gefäße abgebunden bevor die Haut mit Einzelheften verschlossen, die Anästhesie beendet und das Tier für die Aufwachphase in die mit Sauerstoff angereicherte Anästhesiebox gelegt wird.

3.2.2.6 Nachbeobachtungsphase

Sobald die Ratten wieder spontane Atmung erlangen, werden sie extubiert und verbleiben in der mit Sauerstoff angereicherten Narkosebox für 12 Stunden, in der sie freien Zugang zu Wasser und Futter haben. Während der ersten drei Stunden der Aufwachphase werden die Tiere kontinuierlich überwacht.

Tiere mit schwerwiegenden neurologischen Dysfunktionen werden umgehend euthanasiert. Ratten, welche erst gar nicht aus der Narkose erwachen, werden hirntoddiagnostisch untersucht. Diese Untersuchung umfasst eine Beurteilung der Pupillenmotorik, Schmerzreflexe oder die Reaktion auf Terminierung der Beatmung. Wird der Hirntod festgestellt, so wird das Tier unter tiefer Isoflurannarkose entblutet. Alle anderen Tiere werden ihren Käfigen und familiären Gruppen rückgeführt, um dann am ersten postoperativen Tag, exakt 24 Stunden nach Beendigung der EKZ, auf die neurologische Funktion untersucht zu werden.

3.2.3 Untersuchung der neurologischen Funktion

Im Rahmen der neurologischen Untersuchung werden das Bewusstsein, die Sensorik und auch die Motorik eines jeden Tieres in diversen Tests beurteilt. Diese Tests können wichtige Hinweise auf eventuell vorliegende neurologische Defizite geben, die durch passive Beobachtung nicht zu bemerken wären (COMBS und D'ALECY, 1987). Der erste Teil der Untersuchung befasst sich mit der Einschätzung des Bewusstseins und des Pflegeverhaltens. Die sensorisch-motorischen Tests umfassen in der vorliegenden Studie Gleichgewicht im Balkentest (Beam-Walking- und Beam-Balance-Test), sowie Greif- und Haltevermögen (Drahtgitter- und Greif-Zug-Test).

Die neurologische Funktion der überlebenden Tiere wird einen Tag nach der OP, exakt 24 Stunden nach Beendigung der EKZ, gemäß dem Versuchsprotokoll bewertet. Der Untersucher ist gegenüber den zwei verschiedenen Gruppen der Wiedererwärmungsmethoden nach DHCA geblindet.

3.2.3.1 Zeitlicher Verlauf

Die neurologische Untersuchung der Tiere beginnt bereits zwei Tage vor der Operation (Tag - 2). Dieses Vorgehen soll zu einer Gewöhnung der Tiere an die neurologische Untersuchung sichern, zum anderen soll damit ein möglichst identischer, standardisierter neurologischer Status zum Zeitpunkt der Operation geschaffen werden. Am Tag vor der Operation (Tag -1) wird die Untersuchung schriftlich dokumentiert, um den Ausgangswert zur Beurteilung der erhobenen Daten nach der Operation zu erhalten. Genau 24 Stunden nach erfolgter EKZ wird die neurologische Funktion der Tiere abschließend beurteilt und die Tiere danach unter tiefer Isoflurananästhesie schmerzlos getötet.

3.2.3.2 Erfassung und Bewertung

Die neurologische Untersuchung gibt detailliert Aufschluss über nach einem DHCA möglicherweise auftretende neurologische Defizite. Dabei können sowohl die Form, als auch die Ausprägung dieser Defizite stark variieren. Die einzelnen Tests und Parameter, welche zur Beurteilung herangezogen werden, erfolgen immer nach einem hierfür festgelegten Protokoll in einer standardisierten Reihenfolge und beinhalten die Prüfung des Bewusstseins und Pflegeverhaltens, die Evaluierung der motorischen und der sensorischen Funktion. Ein aufsteigendes Punkteschema erleichtert hierbei die Beurteilung und Dokumentation der einzelnen Leistungen im sensorischen Testabschnitt. Dabei bedeutet eine Bewertung mit 0 Punkten die bestmögliche Leistung. Beim motorischen Testabschnitt, wie z.B. dem Drahtgitter-Test, werden diese über Absolutwerte erfasst. Bei Bedarf werden wichtige Informationen zusätzlich dokumentiert.

Bewusstsein und Pflegeverhalten

Einen ersten Eindruck gewinnt man bereits bei dem Beobachten der Tiere im Tierabteil. So kann man anhand des Haarkleides (struppig und /oder rot verschmiert durch das Sekret der Harderschen Drüsen), der Körperhaltung (kyphotisch), der Atmung (Hyperventilation) und anhand des Verhaltens innerhalb der Gruppe (Absondern) erste Veränderungen erkennen. Der Unterschied zwischen einem erkrankten und einem gesunden Tier liegt z.B. in der Beschaffenheit des Fells. Das Fell eines gesunden Tieres ist glatt glänzend und sauber. Des Weiteren verhält sich ein gesundes Tier neugierig erkundend seiner Umwelt gegenüber und schläft dicht gedrängt an seine Gruppenmitglieder. Ein krankes Tier sondert sich im

Gegensatz dazu von der Gruppe ab, vernachlässigt die Fellpflege und zeigt nur wenig Aktivität. Das Bewusstsein wird mit einer Skala von 0 bis 2 Punkten beurteilt, wobei normales Bewusstsein mit null Punkten, gedämpftes oder ruheloses Erscheinungsbild mit einem Punkt und Lethargie mit zwei Punkten bewertet wird. Ebenso wird eine Aussage über das Putzverhalten mit einer Einteilung von normalem, über eingeschränktem bis hin zu nicht vorhandenem Putzverhalten getroffen.

Laufvermögen

Um die Motorik, Muskelkraft und Koordination, aber auch den Gleichgewichtssinn einschätzen zu können, beobachtet man die Tiere beim Laufen über eine Ebene, die eine feste Unterlage in horizontaler Lage darstellen sollte. Dabei beobachtet man die Art und Weise wie sich die Ratte fortbewegt, d.h. ob sie überhaupt fähig ist zu laufen oder ob ihre Mobilität eingeschränkt ist bis hin zu atypischen Fortbewegungsmustern, wie etwa Kreisbewegungen.

Gleichgewicht im Balkentest (Beam-Walking- und Beam-Balance-Test)

Möchte man eine Aussage treffen über das Gleichgewichts- und Koordinationsvermögen, lässt man die Ratte über eine definierte Strecke (3 x 1m) eines 2,5 cm breiten Holzbalkens (Beam-Walking-Test) laufen. Anschließend balanciert die Ratte auf einem 1,5 cm breiten Balken für eine festgelegte Zeit von 3 x 60 Sekunden (Beam-Balance-Test). Beide Holzbalken bestehen aus unbehandeltem Kiefernholz und sind in 40 cm Höhe angebracht. Unter der Holzkonstruktion befindet sich eine 7 cm dicke Schaumstoffmatte, welche die Tiere im Falle eines Sturzes auffängt.

Der Beam-Walking-Test (FEENEY et al., 1982) wird in der Weise durchgeführt, dass das Tier dreimal eine Strecke von 100 cm über den Balken ($d = 2,5$ cm) zurücklegt, wobei eine Strecke einer Balkenlänge entspricht. Ist die Ratte an einem Ende des Balkens angelangt, wird sie vorsichtig mit der Hand in die entgegen gesetzte Richtung dirigiert. Dies wird dreimal praktiziert, um eine Wegstrecke von 300 cm zu erreichen. Die ersten zwei Schritte dienen der initialen Gleichgewichtsfindung und werden deswegen nicht gewertet. Kommt es zu einem Fehltritt wird dieser sowohl von der Anzahl, als auch von der Lokalisation (Vorder- oder Hintergliedmaße, rechts oder links) im Protokoll vermerkt. Ebenso werden anhand der Skala Punkte von null bis vier vergeben. Bei weniger bzw. bis zu drei Fehlschritten erhält das Tier null Punkte der Bewertungsskala, bei vier bis zehn Fehlritten einen Punkt, bei elf bis zwanzig Fehlritten zwei Punkte, bei mehr als zwanzig Fehlritten drei Punkte und bei Immobilität oder

Sturz vier Punkte. Sollte das Tier vor Ende der Volldistanz stürzen, wird die bisher zurückgelegte Strecke gemessen und die Anzahl der Fehlschritte auf die Gesamtstrecke hochgerechnet.

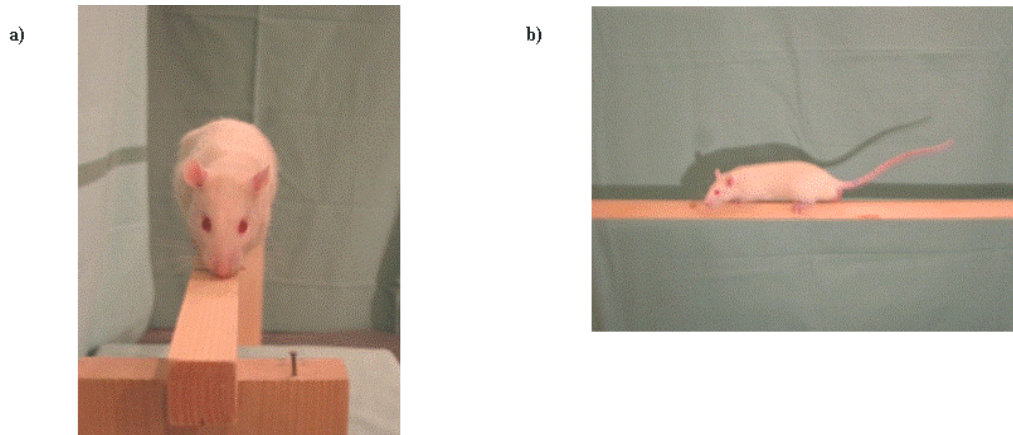


Abbildung 7: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Beam-Walking-Test a) frontal und b) seitlich fotografiert.

Beim Beam-Balance-Test (COMBS und D'ALECY, 1987) muss das Tier für jeweils 60 Sekunden auf einem Balken ($d = 1,5 \text{ cm}$) frei balancieren. Die Ratte wird dazu in einminütigem Abstand insgesamt dreimal auf den Balken gesetzt und die balancierte Zeit für jeden Versuch gestoppt und notiert. Die Punkteverteilung ist wie folgt: null Punkte für eine Maximalzeit von 60 bis 50 Sekunden, einen Punkt für 49 bis 30 Sekunden, zwei Punkte für 29 bis 10 Sekunden und vier Punkte für Loslassen oder Sturz.



Abbildung 8: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Beam-Balance-Test.

Greif- und Haltevermögen (Drahtgitter- und Prehensile-Traction-Test mit Symmetrie der Bewegungen)

Das Greif- und Haltevermögen aller vier Gliedmaßen wird evaluiert, indem sich die Ratte auf einem unterschiedlich geneigten Drahtgitter für eine bestimmte Zeit festhalten soll (Drahtgitter-Test). Zudem wird das Greif- und Haltevermögen der Vordergliedmaße durch Hängen an einem Drahtseil getestet (Prehensile-Traction-Test). Gleichzeitig wird dabei die Symmetrie der Bewegung mit der das Tier das Seil ergreift bewertet. Der Drahtgitter-Test stellt eine Variation des Screen-Tests (COMBS und D'ALECY, 1987) dar. Er dient als Indikator für die allgemeine Muskelkraft. Hierbei wird die Ratte auf ein horizontales Drahtgitter (57 x 50 cm, Lochgitterabstand: 1 cm) gesetzt. Dann wird mit einer umsichtigen, aber raschen Bewegung das Gitter um 90° gedreht und dann um weitere 90°, so dass das Tier letztlich am Gitter hängt. In dieser Position soll es sich für maximal 5 Sekunden halten. Tiere, welche kein motorisch-neurologisches Defizit aufweisen, zeigen keinerlei Probleme bei der Bewältigung dieser Aufgabe. Ratten, welche dagegen in der allgemeinen Muskelkraft geschwächt sind, können sich teilweise nicht für die Maximaldauer von 5 Sekunden halten oder fallen bereits in den ersten Neigungen auf die Schaumstoffmatte, welche sich in einem Abstand von 60 cm unter dem Gitter befindet. Der zuletzt genannte Fall ermöglicht es, den Umdrehreflex zu überprüfen. Physiologischerweise dreht sich die Ratte in jeder Fallposition durch eine Körperdrehung um, um auf allen vier, dem Boden entgegen gestreckten Gliedmaßen zu landen. Die Bewertung erfolgt entsprechend der Skala im Versuchsprotokoll.

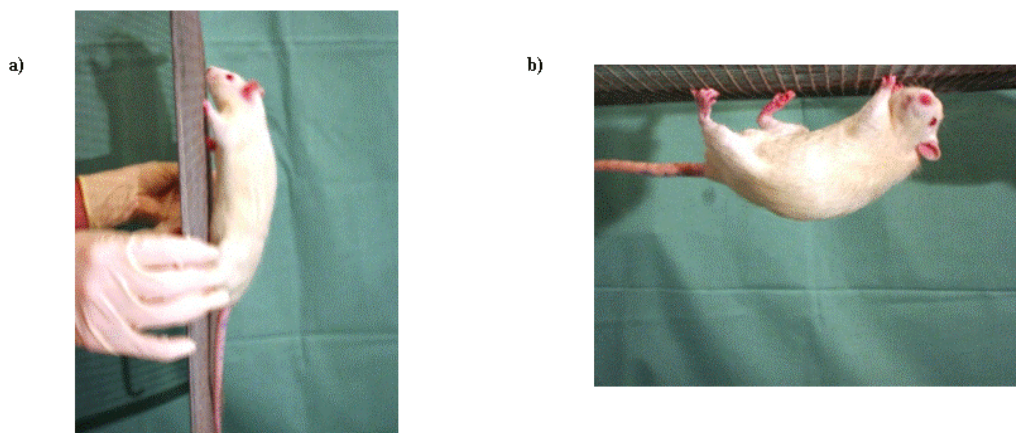


Abbildung 9: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte während der Untersuchung am Drahtgitter a) in 90° - Position und b) in 180° - Position.

Der Greif-Zug-Test stellt eine Abwandlung des Prehensile-Traction-Tests (COMBS und D'ALECY, 1987) dar. Dabei wird die Ratte vorsichtig an der Schwanzbasis genommen und an ein in 40 cm Höhe horizontal gespanntes Drahtseil (60 cm x 0,3 x 0,3 cm) geführt. Dieses soll das Tier mit beiden Vordergliedmaßen ergreifen. Sobald dies geschehen ist, lässt man das Tier los und es wird kontrolliert, ob die Ratte fähig ist, sich für 15 Sekunden am Drahtseil zu halten. Dieser Test wird nach einer Pause ein weiteres Mal durchgeführt und testet einerseits die Muskelkraft und andererseits den Reflex bei Anheben des Tieres an der Schwanzbasis, die Vordergliedmaßen weit auszustrecken und den Körper anzuspannen. Zusätzlich wird die Symmetrie der Bewegung bewertet. Tiere mit Vorliegen einer unilateralen Kortexläsion rollen sich in dieser Position eher zur Schwanzbasis ein und greifen nach dieser (KOLB und WHISHAW, 1985). Bei dieser Untersuchung liegt ebenso eine Schaumstoffmatte zur Abfederung im Falle eines Sturzes bereit.

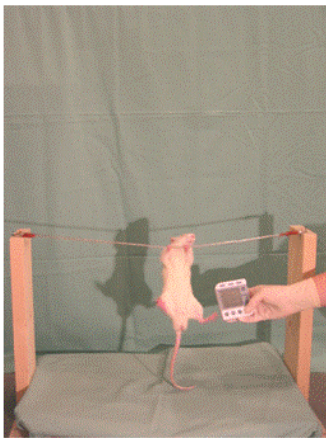


Abbildung 10: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Prehensile-Traction-Test.

Klettern

Das Klettern dient der Beurteilung von Mobilität, des Greif- und Haltevermögens und der Fähigkeit die Hinterbeine anzuziehen und sich aus eigener Kraft hochzuziehen. Dieser Test erfolgt an einem Styroporkorpus, an dessen Außenkante die Ratte mit den Vorderpfoten geführt wird, um dann reflexartig danach zu greifen. Im weiteren Verlauf soll das Tier die Hinterpfoten anziehen und sich unter Aufwendung der eigenen Kraft auf den Styroporkorpus heben. Die Bewertung erfolgt nach einer Punkteskala von null bis vier Punkten. Klettert das Tier auf die 90° Ebene, wird dies mit null Punkten bewertet, hängt das Tier fünf Sekunden und zieht die Hintergliedmaßen an, mit einem Punkt und bleibt das Tier lediglich hängen

ohne die Hintergliedmaßen anzuziehen wird dies mit zwei Punkten beurteilt. Drei Punkte werden veranschlagt, sollte die Ratte sich weniger als fünf Sekunden halten können und vier Punkte müssen berechnet werden, sollte kein Greifreflex vorhanden sein.



Abbildung 11: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Klettern.

Propriozeption und Vibrissenreaktion

Die sensorische Funktion wird anhand der Propriozeption, Vibrissenreaktion und des Sehens, sowie des Hörvermögens beurteilt. Um die Propriozeption zu bewerten, wird mit einem Kugelschreiber oder Finger ein Reiz in die linke bzw. rechte Abdominalgegend caudal des Rippenbogens gesetzt. Als Reaktion wird eine Kopf- oder Körperdrehung in die jeweilige Richtung erwartet. Die Bewertung erfolgt analog zur unten beschriebenen Vibrissenreaktion.



Abbildung 12: Untersuchung der Propriozeption am Beispiel einer nicht geschädigten Ratte.

Anhand der Vibrissenreaktion beurteilt man die Reaktion des Tastorgans auf äußere Reize. Der Untersucher streicht dabei vorsichtig mit einem Kugelschreiber außerhalb des Sehfeldes seitlich über die Vibrissen des Tieres. Dreht sich die Ratte interessiert in die jeweilige Richtung, wird die Reaktion als normal = 0 Punkte beurteilt. Erfolgt auf den gesetzten Reiz nur eine verminderte oder undeutliche Reaktion, ist die Vibrissenreaktion als eingeschränkt und somit mit einem Punkt zu bewerten, sind beide Seiten betroffen, gilt die Reaktion als nicht vorhanden.

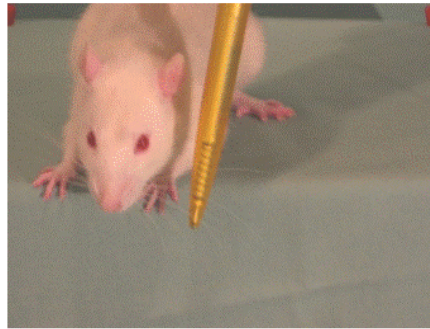


Abbildung 13: Untersuchung der Vibrissenreaktion am Beispiel einer gesunden Ratte.

Hör- und Sehvermögen

Das Hörvermögen wird durch Setzen eines akustischen Signals überprüft. Dieses Signal kann in die Hände klatschen oder mit den Fingern schnipsen sein, wobei der Untersucher darauf achten sollte, hinter dem Tier zu stehen. Bei letzterem ist jedes Ohr für sich überprüfbar, da die Reaktion direkt am Ohrenspiel des Tieres sichtbar ist. Dreht das Tier den Kopf Richtung Geräuschkulisse oder zeigt das so genannte Ohrenspiel, so ist dieses als normal = null Punkte zu bewerten, zeigt es keinerlei Reaktion so ist diese mit einem Punkt und somit als eingeschränkt zu beurteilen.

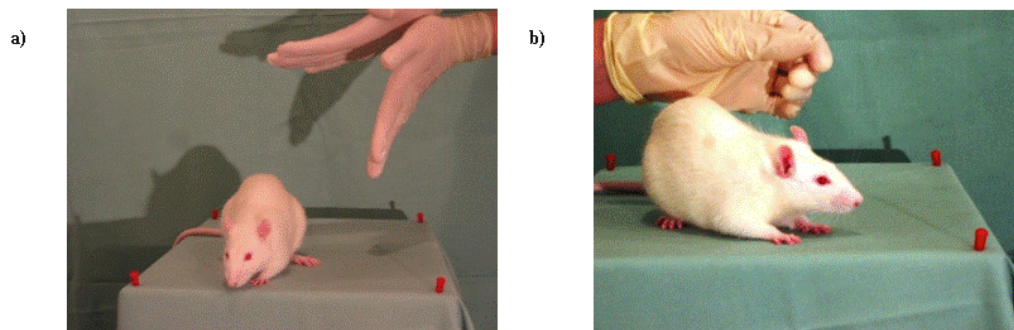


Abbildung 14: Untersuchung des Hörvermögens am Beispiel einer Ratte a) durch Klatschen in die Hände und b) durch Finger schnipsen.

Das Sehvermögen der Tiere wird getestet, indem ein Wattebausch von erhöhter Position im lateralen Gesichtsfeld der Ratte fallengelassen wird. Dabei sollte möglichst kein Geräusch verursacht werden und auch keine Berührung erfolgen. Dreht das Tier den Kopf in die Richtung des Wattebausches, so ist das Sehvermögen vorhanden und ist mit null Punkten zu bewerten. Ist keine Reaktion zu beobachten, so wird dieses mit einem Punkt protokolliert. Ist das Sehvermögen auf beiden Gesichtshälften nicht feststellbar, werden zwei Punkte vergeben und somit nicht vorhanden.

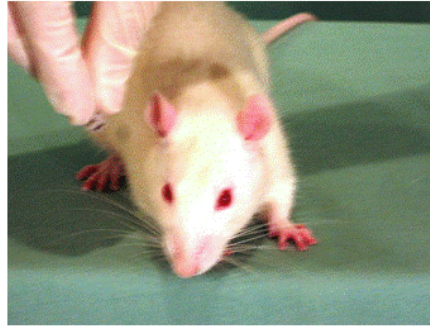


Abbildung 15: Untersuchung des Sehvermögens am Beispiel einer Ratte.

3.2.4 Entnahme und Untersuchung des Gehirns

Am postoperativen Tag 1, nach erfolgter neurologischer Untersuchung werden die Ratten mit 5,0 Vol % Isofluran anästhesiert, durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn *in toto nativ* entnommen. Danach wird es in Tissue Tec (Leica Microsystems® GmbH, Nussloch, Deutschland) fixiert. Tissue Tec ist eine bei Raumtemperatur flüssige Substanz, welche bei Minus-Temperaturen fest wird und somit das Organ fest umschließt. Dazu wird das Tissue Tec in einer ersten Schicht in kleine Aluzylinder verbracht und dann das Gehirn auf die Masse gelegt. Eine zweite Schicht des Tissue Tec wird über das Gehirn plaziert. Danach werden die Proben in Methylbutan bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Trockeneis gelagert, um sie schnell zu gefrieren und damit eine Autolyse zu verhindern. Zu einer späteren Verarbeitung des Gehirns werden die Proben bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit der hinteren Kleinhirnseite aufgetaut. Um sich langsam der gewünschten Stelle zu nähern, werden sogenannte Trimm-Schnitte zu 80μ koronar bis zum Bezugspunkt P300 μ gefertigt. Die Späne dieser Trimm-Schnitte werden in einem 50 ml-Falcon-TPP-Tube bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Dann fertigt man jeweils zwei Schnitte für fünf bis sechs Superfrost-Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) à 10μ mit dem Kryotom/Mikrotom (HM 355, Microm International GmbH, Walldorf) an. Ein weiteres Mal werden Trimm-Schnitte zu 80μ bis zur Ebene P3300 μ erstellt. Die dabei anfallenden Späne werden wie bereits oben beschrieben verwahrt. Für weitere fünf bis sechs Objektträger werden jeweils zwei Schnitte à 10μ angefertigt. Bevor ein letztes Mal aus der nun anfallenden Kleinhirnregion zwei Schnitte pro Objektträger entnommen werden können, müssen wiederum Trimm-Schnitte bis zur Ebene P 9300 bereitete werden, welche behandelt werden wie zuvor. Der restliche Teil des Gehirns wird in 80μ geschnitten und in dem genannten Falcon aufbewahrt.

3.2.5 Untersuchungen auf der molekular-biologischen Ebene

3.2.5.1 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine identifiziert und semi-quantitativ bestimmt werden. Dazu werden die Proteine in einem Gel im elektrischen Feld, abhängig von ihrer Größe aufgetrennt. Danach wird das Gel auf eine Membran transferiert. Auf der Membran werden die gesuchten Proteine dann mittels eines spezifischen Antikörpers (AK) nachgewiesen.

Probenaufbereitung

Für die Gewebeaufbereitung gibt man Späne der Hirnschnitte, die beim Schneiden der Gehirne anfallen (Kapitel 3.2.4), in Lysispuffer mit einer Mahlkugel (Durchmesser 5mm). Das Gewebe wird dann in einer Kugelmühle lysiert. Danach zentrifugiert man die Gewebesuspension und pipettiert den Überstand ab. Ein Teil wird zur Proteinkonzentrationsbestimmung mit PBS (1:50) verdünnt. Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe von Bradford-Reagenz photometrisch anhand des Farbumschlags bestimmt. Anschließend werden die Proben auf 20 µg Proteingehalt in 30-50 µl Gesamtgehalt mit PBS und SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid)-Probenpuffer verdünnt.

Gele gießen

Unter Verwendung des diskontinuierlichen Verfahrens mit dem SDS-PAGE-System (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System) nach (LAEMMLI, 1970) wird die Gelelektrophorese durchgeführt. Dieses diskontinuierliche Verfahren besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel, die sich beide vom pH, der Ionenstärke und der Porengröße unterscheiden. Die Gele werden 24 Stunden vorher gegossen, damit sie am Tag der Verwendung voll auspolymerisiert sind. Die Gele enthalten je nach gesuchtem Protein einen höheren oder niedrigeren Polyacrylamidanteil, d.h. je kleiner das gesuchte Protein, umso größer der Polyacrylamidanteil und desto engmaschiger ist das Gel.

Tabelle 2: Proteine und ihre Gele mit entsprechendem Polyacrylamidanteil in %

Protein	Gel mit Polyacrylamidanteil in %
TNF- α	12 %
I-kB	10 %
COX-2	8 %

Elektrophorese

Die Gele werden bei Raumtemperatur befüllt. In jede Tasche werden 20 μ g Protein pipettiert. Zusätzlich wird Proteinmarker („Protein Precision Plus“, Fa. Bio-Rad Laboratories, München) mit aufgetragen. Dieser Marker besteht auch aus einem Proteingemisch, das je nach Molekülgröße unterschiedlich dicke Proteinbanden liefert und zur Zuordnung der Banden dient. Danach erfolgt für 3 bis 4,5 Stunden unter Wasserkühlung und einer Stromstärke von 200 V die Elektrophorese. In diesem Zeitraum werden die Proteine entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt.

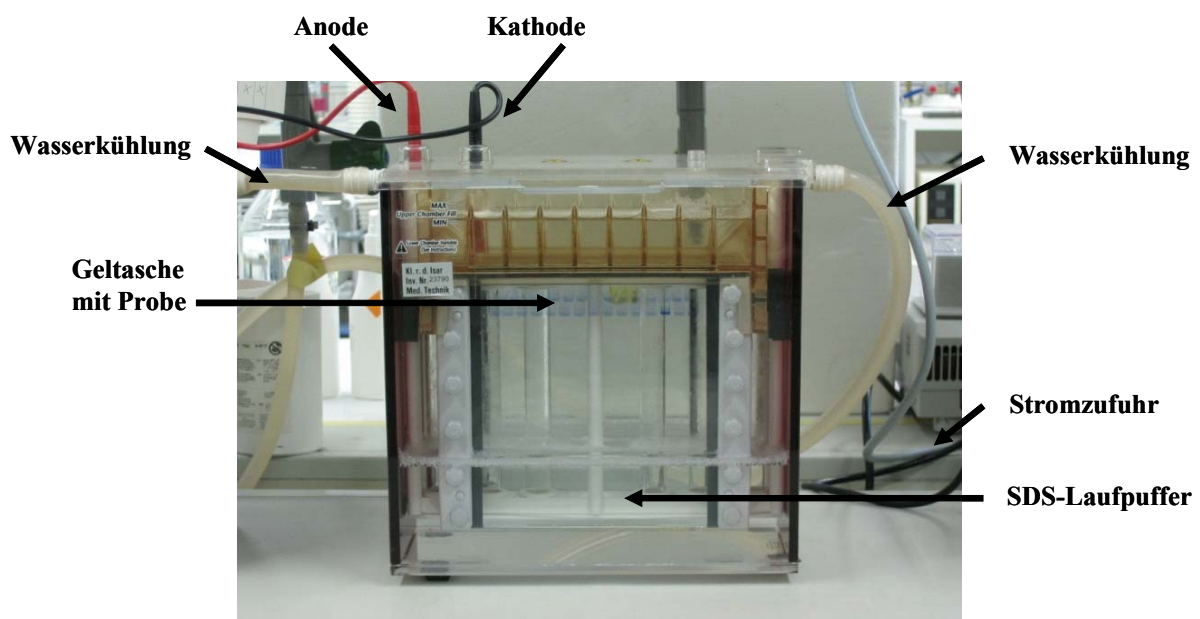


Abbildung 16: Elektrophoresekammer mit befüllten SDS-Gelelen.

Proteintransfer

Der Proteintransfer auf die Membran wird mit Hilfe des „Semi-dry“ Verfahrens durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt der Transfer über Puffer-gesättigte Filterpapiere auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Filterpapiere gut durchfeuchtet sind. Die Gele werden aus den Elektrophoresekammern vorsichtig entnommen und auf die Filterpapiere in die Blotkammer gelegt. Dabei muss man unbedingt darauf achten, die Filterpapiere als auch Membran und Gel blasenfrei aufzulegen, da die Luftblasen den Transfer behindern würden. Zuletzt wird noch das Filterpapier mit Kathodenpuffer auf die bisher eingelegten Schichten verbracht und evt. bestehende Luftblasen herausgestrichen. Die Blotkammer wird mit dem Deckel verschlossen und die Proteine bei 200mA pro Gel über zwei Stunden transferiert.

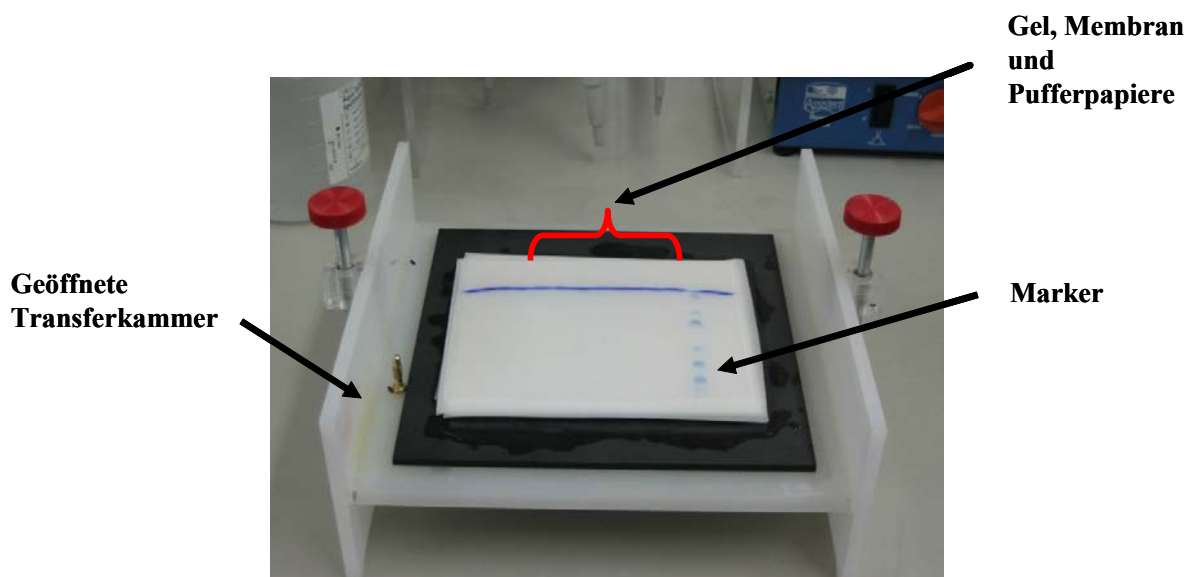


Abbildung 17: Geöffnete Transferkammer mit Gel, Membran und Pufferpapieren.

Aufbringen der Antikörper

Nach dem Transfer erfolgt eine 30 minütige Waschung der Membranen in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween (Phosphate-Buffered-Saline Tween; PBST).

Das Blockieren der Membran oder auch Immunoblot genannt, geschieht in diesem Versuch mittels 10 % igem Milchpulver (TNF- α), oder 10 % igem bovinem Serumalbumin (COX-2, I-kB). Die Membranen werden hierfür zusammen mit dem Blockierungsmedium in eine kleine

Plastiktüte eingeschweißt und für 60 Minuten auf den Schüttler gelegt, um sie gleichmäßig mit dem Blockierungsmedium in Kontakt zu bringen.

Nun folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Je nach gesuchtem Protein wird, wie in der Tabelle 2 dargestellt, ein spezifischer Antikörper verwendet.

Tabelle 3: Proteine mit ihren jeweiligen Verdünnungen und Antikörpern

Protein	Verdünnung	Antikörper
TNF-α	1:10 000	Anti-rat Tumor Necrosis Factor-alpha (Acris GmbH, Hiddenhausen)
I-κB	1:500	Phospho-I κ B- α (Ser32/36) (5A5) Mouse mAb (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers)
β- Aktin	1:500	Monoclonal Anti- β -Actin Clone AC-15 FITC Conjugate (Sigma®, Missouri)
COX-2	1:1000	COX-2 (human) Polyclonal Antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor)

Die Membran wird mit 10 ml Antikörpersuspension in entsprechender Verdünnung (s.o.) in eine Tüte eingeschweißt und bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran aus der Tüte entnommen, in PBST gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, anti-mouse oder anti-rabbit, je nach Primärantikörper, für zwei Stunden inkubiert.

Bevor man die eigentliche Entwicklung des Western Blots beginnt, startet man mindestens 10 Minuten vor der Messung die dafür notwendige Kodak Image Station 440 CF (Kodak GmbH, Stuttgart). Man lässt die Membran abtropfen und legt diese in die dafür vorgesehene Plastikschißel. Man gibt die Chemilumineszenz – Reagenzien über die abgetropfte Membran und schwenkt die Flüssigkeit für eine Minute, so dass die Membran gut durchfeuchtet ist. Anschließend bringt man die Membran blasenfrei auf die Image Station auf. Nach einer Belichtungszeit von einer Stunde wird das aufgenommene Bild dann abgespeichert, und die Membran nach kurzem Waschen in PBS getrocknet.

Dieselbe Membran wird zur weiteren Bestimmung des β -Aktins verwendet. Dazu inkubiert man die Membran mit β -Aktin-Antikörper (Verdünnung 1:500 in 10 % igem bovinem Serum-

albumin, 60 min wieder in eine Tüte eingeschweißt. Das Protokoll für die β -Aktin Detektion entspricht dem oben Beschriebenen.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt anschließend mit der Software der Kodak Image Station („Kodak ID Image Analysis Software“, Eastman Kodak Company, Rochester, USA). Dabei wird die Leuchtintensität der gesuchten Banden bestimmt und gegen β -Aktin normalisiert, indem man die sogenannte „Ratio“ des gesuchten Proteins zu β -Aktin bildet.

3.2.5.2 Histologie

Doppelfärbung

Man fixiert die Gefrierschnitte zehn Minuten in 4 %igem Paraformaldehyd (eigene Herstellung) bei Raumtemperatur. Nach einem Waschgang blockiert man Peroxidase mit 3 %igem H₂O₂-Methanol. Nach erneutem Waschen trägt man die Blockierung (DAKO serum-free protein block, DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark) auf.

Zuerst wird der Primär-Antikörper gegen NFκB p65 (NFκB phospho S276 antibody rabbit polyclonal to NFκB p65, BIOZOL, Eching, Deutschland) 1:500 verdünnt mit einem DAKO serum-free protein block (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark) aufgetragen und damit inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS, trägt man den Sekundär-Antikörper (ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in 1:200 Verdünnung auf. Nach einem weiteren Waschgang in PBS wird Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin (R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA) zugegeben und danach DAKO Diaminobenzidin (DB; DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark) aufgetragen, um die braune Farbe zu entwickeln. Im zweiten Teil der Doppelfärbung trägt man den Primär-Antikörper gegen NeuN (Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody; CHEMICON International Inc., Temecula, California, USA) auf und inkubiert diesen in einer Verdünnung von 1:1000. Nach dem Waschen in PBS, trägt man den biotinylierten anti-mouse Sekundär-Antikörper (ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in einer Verdünnung 1:200 auf und inkubiert. Danach gibt man alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin (Alkaline Phosphatase Streptavidin; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA) in einer Verdünnung 1:1000 hinzu. Anschließend inkubiert man mit Vector Red (Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; VECTOR Laboratories, Inc., California, USA). Danach deckt man die Schnitte ein und lagert sie bei Raumtemperatur.

HE-Färbung

Die HE-Färbung erfolgt nach einem Standardprotokoll. Nach Fixierung in Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt) färbt man zuerst die basophilen Strukturen mit dem Hämalaun nach Mayer (hausinterne Apotheke). Nach dem Bläuen in Leitungswasser färbt man dann die Schnitte mit dem Eosin (wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, hausinterne Apotheke).

Die Schnitte bewertet ein geblindeter Untersucher durch manuelles Auszählen der absoluten Zellzahl. Der neuronale Zellschaden wird in fünf ausgewählten Gehirnregionen untersucht: Frontaler Kortex (motorisches Gebiet), Zingulum (posteriorer Anteil), Striatum (Nukleus kaudatus und Putamen), Hippokampus und Zerebellum. Von jeder Region werden fünf hoch vergrößerte (10 x 40) Felder („High Power Field“, HPF) untersucht und in den jeweiligen Feldern die geschädigten Neuronen anteilig der ungeschädigten Neuronen gezählt.

Eine Differenzierung zwischen den vitalen und den geschädigten Neuronen ist möglich anhand der unterschiedlichen Färbung. Während vitale Neuronen sich durch ein basophiles Zytoplasma mit ebenso basophilem Zellkern und deutlich sichtbarem Nukleolus dunkelblau darstellen, sind geschädigte Neurone entweder eosinophil (pink) gefärbt oder pyknotisch („dark neurons“) mit hochgradig basophilem Zytoplasma und pyknotischem oder karyorhektischem Zellkern ohne erkennbaren Nukleolus.

3.3 Statistische Bewertung der Befunde

Bei der Untersuchung der physiologischen Variablen finden hierarchisch gegliederte, allgemeine, lineare Modelle ihre Anwendung. Dabei wird der Zeitraum quadratisch erfasst (Zeit²) und der Wechselwirkungsfaktor aus Zeit und Gruppe untersucht. Ergibt sich ein Unterschied zwischen den Gruppen über den Versuchszeitraum wird mit Hilfe einer faktoriellen Anova post hoc jeder Untersuchungszeitpunkt auf einen Unterschied hin untersucht.

Die neurologische Funktion wird mit dem Mann-Whitney-U-Test am ersten postoperativen Tag ausgewertet. Daran schließt sich der Wilcoxon-Test an, der den zeitlichen Verlauf überprüft. Die getestete Hypothese ist, dass sich die beiden Populationen, aus denen die Wertepaare stammen, nicht unterscheiden.

Die Parameter des Western Blots und der Histologie werden mit dem Kruskal-Wallis-Test und posthoc mit dem Nemenji-Test ausgewertet. Da die beiden Wiedererwärmungsgruppen (langsam und schnell) inklusive Gruppe der Nativtiere verglichen werden, wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser Test ist ein nichtparametrisches Verfahren zum Vergleich von Mittelwerten mehrerer Stichproben (> 2) und dient dem Vergleich der Gruppen untereinander. Für die Merkmale, die einen Unterschied zwischen den Gruppen aufzeigen, wird der Nemenyi-Test im Anschluss durchgeführt, um herauszufinden, welche der Gruppen sich signifikant unterscheiden.

Die histologische Gesamtzahl eosinophil gefärbter Neurone ergibt sich aus dem bereits beschriebenen Schema der histologischen Auswertung (siehe 3.2.5.4). Fünf Gehirnareale (Hippokampus, motorischer Kortex, Zerebellum, Zingulum und Striatum jeder Gehirnhälfte) mit jeweils fünf beurteilten Feldern („High power fields“) werden betrachtet und durch manuelles Auszählen die Gesamtzahl eosinophiler Neurone ermittelt.

3.4 Ergebnisse

In die hier vorliegende Studie werden männliche Sprague Dawley Ratten mit Gewichten zwischen 330 bis 390 g randomisiert in drei Gruppen (unoperierte Kontrollgruppe sowie langsame und schnelle Wiedererwärmung), wobei eine Gruppengröße von 10 Tieren angestrebt wird. Drei Ratten (zwei Tiere der schnellen und ein Tier der langsamen Wiedererwärmungsgruppe) werden aufgrund von Präparationsfehlern (Blutung der Schwanzarterie, schlechte Drainage, Perforation der V. jugularis bei der Katheterisierung) ausgeschlossen. Diese Tiere werden aber ersetzt, um die angestrebte Gruppengröße von 10 Tieren zu erreichen. Postoperativ kommt es zu keinen Verlusten von Tieren. Somit liegt die Überlebensrate für die Tiere, die in die Datenanalyse eingehen bei 100%.

3.4.1 Physiologische Parameter der operativen Phase

Während der operativen Phase werden die physiologischen Parameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Hämoglobin (Hb), arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Basenüberschuss (BE) und Blutglukose regelmäßig kontrolliert und zu bestimmten Messzeitpunkten dokumentiert (siehe Tabelle 3). Die Messzeitpunkte der Variablen erfolgen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten: vor Extrakorporaler Zirkulation (prä-EKZ), vor tief hypothermem Kreislaufstillstand (prä-DHCA), fünf min nach Start der Wiedererwärmung (post-DHCA), fünf min vor Abgang von der EKZ (EKZ-Ende) und eine h nach EKZ (post-EKZ). Die daraus errechneten Mittelwerte und Standardfehler sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Physiologische Parameter der zwei Wiedererwärmungsgruppen während der operativen Phase

Gruppe (n = 10)		prä-EKZ	prä-DHCA	post-DHCA	EKZ-Ende	post-EKZ	Zeit ² x Gruppe	Zeit ²	Gruppe
MAP (mmHg)	langsam	85 ± 2	53 ± 4	40 ± 2	1)	88 ± 2	n.s.	p < 0.01	n.s.
	schnell	39 ± 1	82 ± 3	50 ± 3		86 ± 2			
Hb (g/dl)	langsam	14,1 ± 0,3	6,8 ± 0,2	6,4 ± 0,2	7,1 ± 0,2	10,5 ± 0,2	n.s.	p < 0.01	n.s.
	schnell	14,0 ± 0,2	6,9 ± 0,2	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	10,8 ± 0,2			
paO₂ (mmHg)	langsam	148 ± 18	513 ± 17	378 ± 13	323 ± 24	199 ± 13	n.s.	p < 0.01	n.s.
	schnell	170 ± 8	526 ± 19	390 ± 13	338 ± 16	186 ± 8			
BE (mmol/l)	langsam	2,1 ± 0,5	-1,9 ± 0,5	-5,8 ± 0,5	2)	2)	n.s.	n.s.	n.s.
	schnell	1,9 ± 0,5	-1,6 ± 0,5	-5,9 ± 0,6					
Glukose (mg/dl)	langsam	110 ± 5	182 ± 17	269 ± 19	293 ± 26	180 ± 15	n.s.	n.s.	n.s.
	schnell	129 ± 5	189 ± 10	286 ± 18	298 ± 17	180 ± 14			

Vergleichende Graphik der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (\pm SEM) der gemessenen Parameter (Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Hämoglobin (Hb), arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO₂), Basenüberschuss (BE) zu fünf verschiedenen Zeitpunkten. (1) Der MAP wird mit einer Norepinephrininfusion über 50 mmHg gehalten. (2) Der BE wird ab Beendigung der DHCA und eine Stunde nach EKZ kontrolliert und in physiologischen Grenzen gehalten. Deshalb werden diese beiden Parameter hier nicht statistisch analysiert. Die Bezeichnung Zeit² x Gruppe beschreibt den Einfluss der Gruppe (Wiedererwärmung) auf die einzelnen Parameter. Bei allen Parametern ist kein statistisch signifikanter Einfluss der Gruppe feststellbar. Im Zeitverlauf (Zeit²) weisen die Parameter MAP, Hb und paO₂ auf statistisch signifikante Veränderungen hin.

Der **mittlere arterielle Blutdruck (MAP)** ist in der Gruppe der langsamen Wiedererwärmung anfangs leicht erhöht, sinkt dann aber zum Ende der Abkühlungsphase (prä-DHCA) auf vergleichbare Werte. Zu Beginn der Wiedererwärmung (post-DHCA) und auch eine Stunde nach EKZ (post-EKZ) steigen die Werte in der langsamen Wiedererwärmungsgruppe dann wieder leicht an. Die Wiedererwärmung hat keinen signifikanten Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck. Lediglich im Zeitverlauf ist eine Signifikanz erkennbar (siehe Tabelle 4).

Die **Hämoglobinkonzentration (Hb)** fällt vom Ausgangswert (prä-EKZ) auf ca. die Hälfte des Wertes bis zu Beginn der Wiedererwärmung. Erst zum Ende der EKZ (EKZ-Ende) kommt es zu einem Anstieg der Werte. Die Zeit scheint auch hier einen signifikanten Einfluss auf die Werte der Hämoglobinkonzentration zu haben, allerdings ist zwischen den Gruppen kein Unterschied feststellbar (siehe Tabelle 4).

Der **arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂)** der langsamen Wiedererwärmungsgruppe liegt erheblich unter den Werten, die in der Gruppe der schnellen Wiedererwärmung gemessen wurden. Es zeigt sich aber keine Signifikanz zwischen den Gruppen. Nur nach erfolgter EKZ (post-EKZ) übersteigen die Werte die, der schnellen Wiedererwärmungsgruppe. Mit steigender EKZ-Dauer verschlechtern sich die Werte beider Wiedererwärmungsgruppen (siehe Tabelle 4).

Der **arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO₂)** ist in beiden Gruppen nahezu gleich. So sind nur die Ausgangswerte der langsamen Wiedererwärmungsgruppe (prä-EKZ) leicht erniedrigt, um dann zum Ende der EKZ (EKZ-Ende) leicht anzusteigen.

Der **Basenüberschuss (BE)** ist in der Gruppe der langsamen Wiedererwärmung vor Beginn der EKZ (prä-EKZ) und zum Ende der Abkühlungsphase geringgradig erhöht, reguliert sich aber zum Beginn der Wiedererwärmung (post-DHCA) auf nahezu die gleichen Werte wie die der schnellen Wiedererwärmungsgruppe. Ab diesem Zeitpunkt (post-DHCA) werden die Werte reguliert, weshalb auch keine Veränderungen innerhalb der Gruppen bezogen auf den weiteren Zeitverlauf, analysiert werden (siehe Tabelle 4).

Die Ausgangswerte (prä-EKZ) der **Blutglukosekonzentration** sind in der langsamen Wiedererwärmungsgruppe erheblich erniedrigt. Die Werte bleiben in dieser Gruppe auch zum Ende der Abkühlungsphase (prä-DHCA), zu Beginn der Wiedererwärmung (post-DHCA) und bis zum Ende der Wiedererwärmung (Ende EKZ) gegenüber den Werten der schnellen

Wiedererwärmungsgruppe tendenziell erniedrigt. Eine Stunde nach Abgang von der EKZ (post-EKZ) erreicht die langsame Wiedererwärmungsgruppe die gleichen Werte wie die Gruppe der schnellen Wiedererwärmung (siehe Tabelle 4).

3.4.2 Neurologische Parameter

Zur statistischen Auswertung gehen die neurologischen Untersuchungsergebnisse (prä- und postoperativ) aller überlebenden Tiere ein. Die Tiere werden je nach Erwärmungsmethode (langsame oder schnelle Wiedererwärmung) randomisiert in zwei Gruppen (langsam und schnell) eingeteilt.

Die neurologische Untersuchung der Tiere wird prä- und postoperativ durchgeführt, um einen präoperativen Ausgangswert zu ermitteln, gegen den dann die postoperativ am Tag 1 erhobenen Werte verglichen werden können. So sollen die beiden unterschiedlichen Wiedererwärmungsstrategien hinsichtlich ihres Einflusses auf Motorik und Sensorik der Tiere verglichen werden.

Tabelle 5: Parameter im Verhältnis zur jeweiligen Wiedererwärmungsmethode

	Zeitpunkt der Untersuchungen	langsame Wiedererwärmung	schnelle Wiedererwärmung
Beam-Walking (Anzahl der Fehlritte)	präoperativ	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	postoperativ	22,3 ± 13,0*	16,8 ± 9,5*
Beam-Balance (Verweildauer in s)	präoperativ	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0
	postoperativ	49,0 ± 5,1	53,10 ± 5,6
Rotating-Grid (Verweildauer in s)	präoperativ	4,9 ± 0,1	4,8 ± 0,3
	postoperativ	4,8 ± 0,2*	4,4 ± 0,3*
Prehensile-Traction (Verweildauer in s)	präoperativ	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0
	postoperativ	12,2 ± 1,1*	11,3 ± 1,4*
Sensibilität (Punktesumme)	präoperativ	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4
	postoperativ	0,0 ± 0,0	1 ± 1,1

*Vergleichende Graphik der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (\pm SEM) der neurologischen Parameter für Beam-Walking, Beam-Balance, Rotating-Grid und Sensibilität zu den verschiedenen Wiedererwärmungsmethoden zu definierten Zeitpunkten (prä- und postoperativ). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe. Punktesummen gemäß Definition aus dem Score (Kapitel 3.2.3.2)*

Das Gleichgewichtsvermögen sowohl im **Beam-Walking** als auch im **Beam-Balance-Test** unterscheidet sich initial in keiner Gruppe. Postoperativ (Tag 1 nach OP) sind die Beam-Walking-Werte beider Wiedererwärmungsgruppen im Vergleich zum präoperativ erhobenen Ausgangswert signifikant schlechter. Zwischen den Gruppen ist kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar.

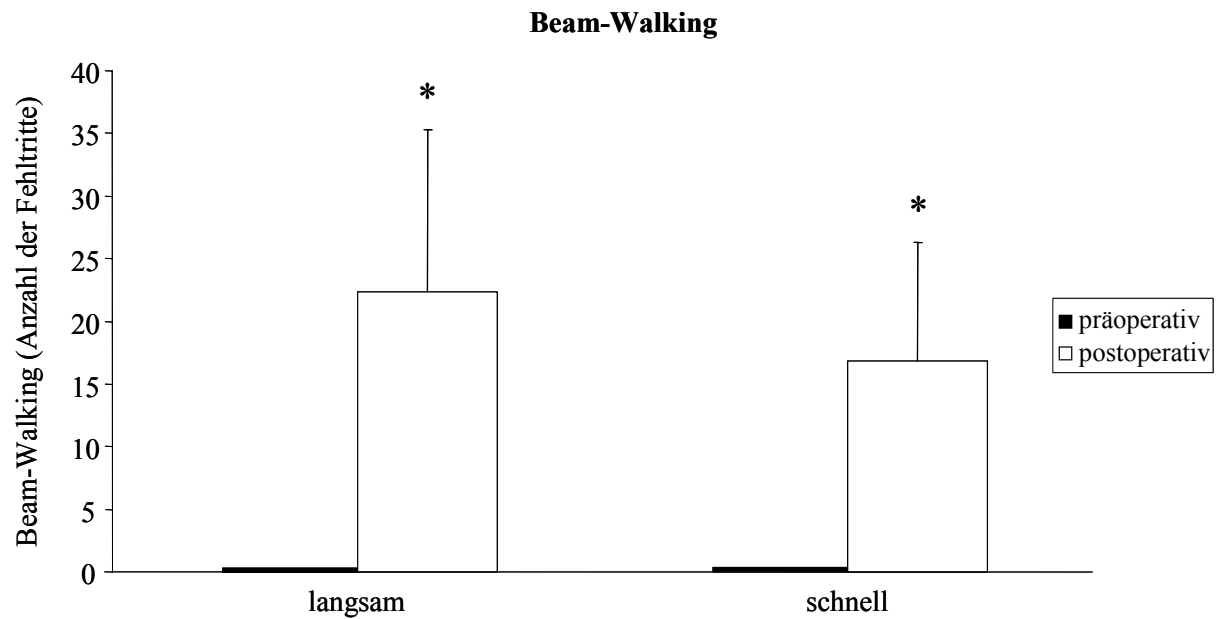


Abbildung 18: Vergleichende graphische Darstellung der MW \pm SEM der Anzahl der Fehlritte zum jeweiligen Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- oder postoperativ) je nach Wiedererwärmungsmethode. Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

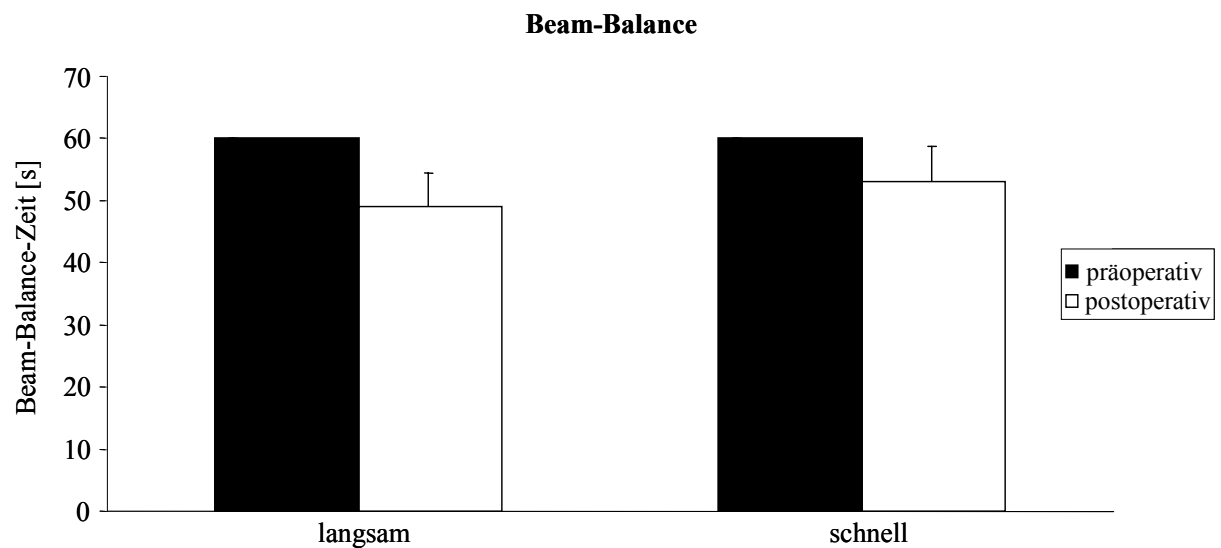


Abbildung 19: Graphische Darstellung der MW \pm SEM der Verweildauer (Beam-Balance-Zeit in s) zum Zeitpunkt der jeweiligen neurologischen Untersuchung und der Wiedererwärmungsmethode.

Das Greif- und Haltevermögen beim Rotating-Grid (Drahtgitter-Test) ist in der schnellen Wiedererwärmungsgruppe präoperativ vergleichbar mit dem der langsamen Wiedererwärmungsgruppe. Postoperativ sind die erhobenen Werte bei beiden Gruppen niedriger als die präoperativen Werte, ein signifikanter Unterschied ist aber nicht vorhanden. Zwischen den Gruppen und damit den unterschiedlichen Wiedererwärmungsgeschwindigkeiten ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

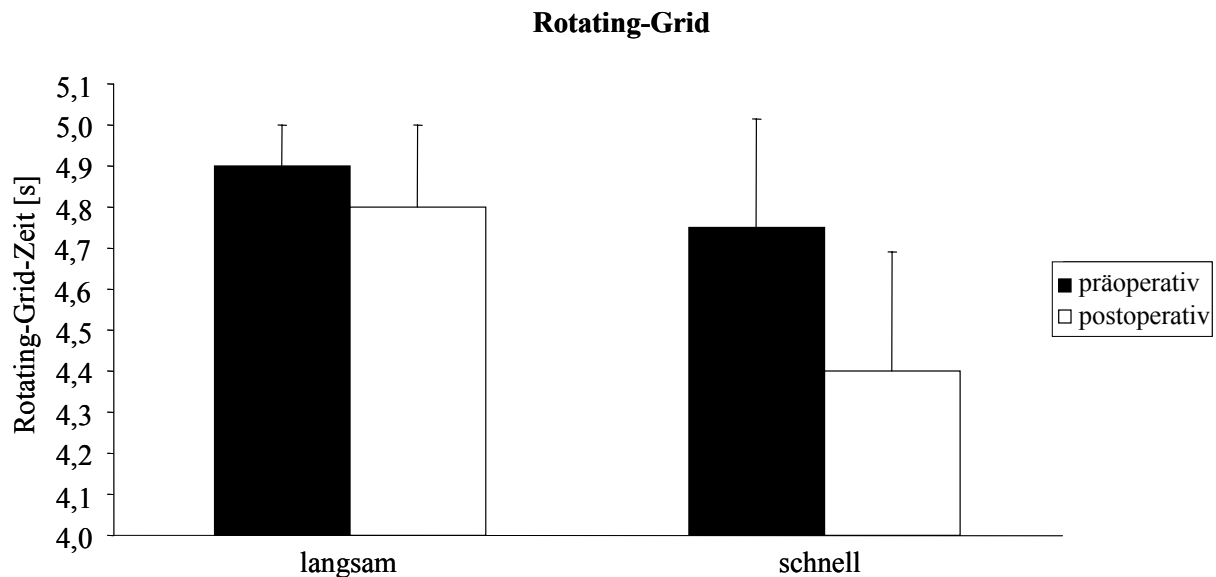


Abbildung 20: Graphische Darstellung der $MW \pm SEM$ der Verweildauer (Rotating-Grid-Zeit in s) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- oder postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode.

Die Mittelwerte für das Greif- und Haltevermögen im **Prehensile-Traction-Test** liegen präoperativ bei beiden Gruppen im Normbereich. Am Tag nach der EKZ (postoperativer Tag 1) ist das Greif- und Haltevermögen in beiden Gruppen eingeschränkt, unterscheidet sich aber nicht signifikant voneinander. Vergleicht man hingegen jeweils die präoperativen Ausgangswerte beider Wiedererwärmungsgruppen mit den postoperativen Werten, so sind die Tiere postoperativ signifikant schlechter.

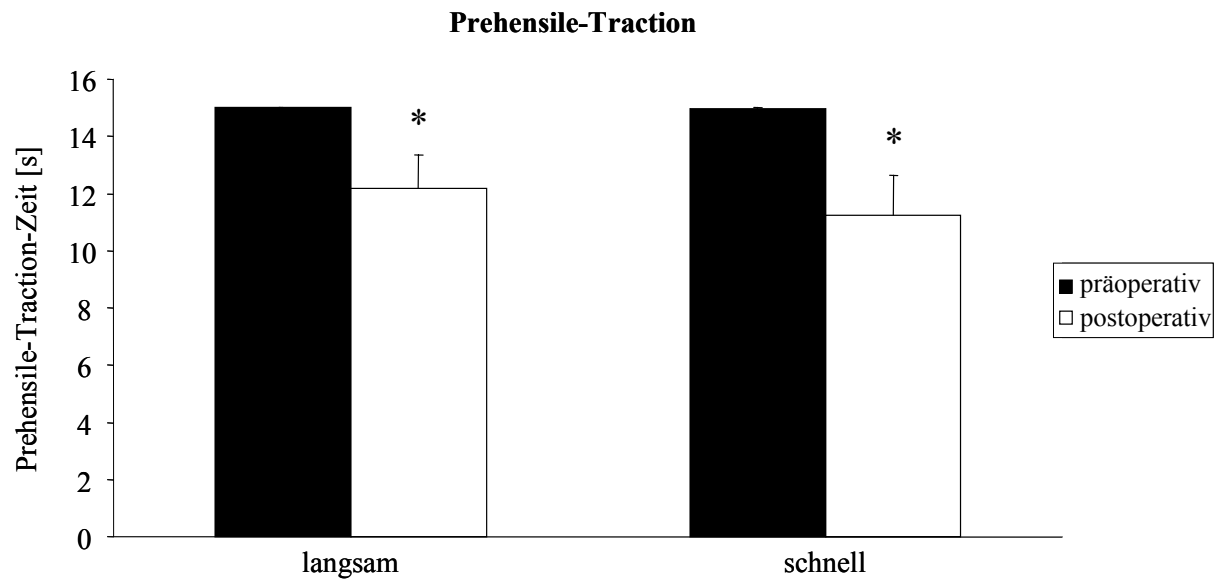


Abbildung 21: Graphische Darstellung der $MW \pm SEM$ der Haltezeit (Prehensile-Traction-Zeit in s) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- und postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode. Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

Im sensorischen Testabschnitt zeigen sich in beiden Untersuchungsgruppen präoperativ keine Abweichungen von der Norm. Erst postoperativ steigen die Mittelwerte der schnellen Wiedererwärmungsgruppe im Vergleich zu den Werten der langsamen Wiedererwärmungsgruppe deutlich an, erreichen aber kein Signifikanz-Niveau. Zwischen den Gruppen ist auch kein signifikanter Unterschied festzustellen.

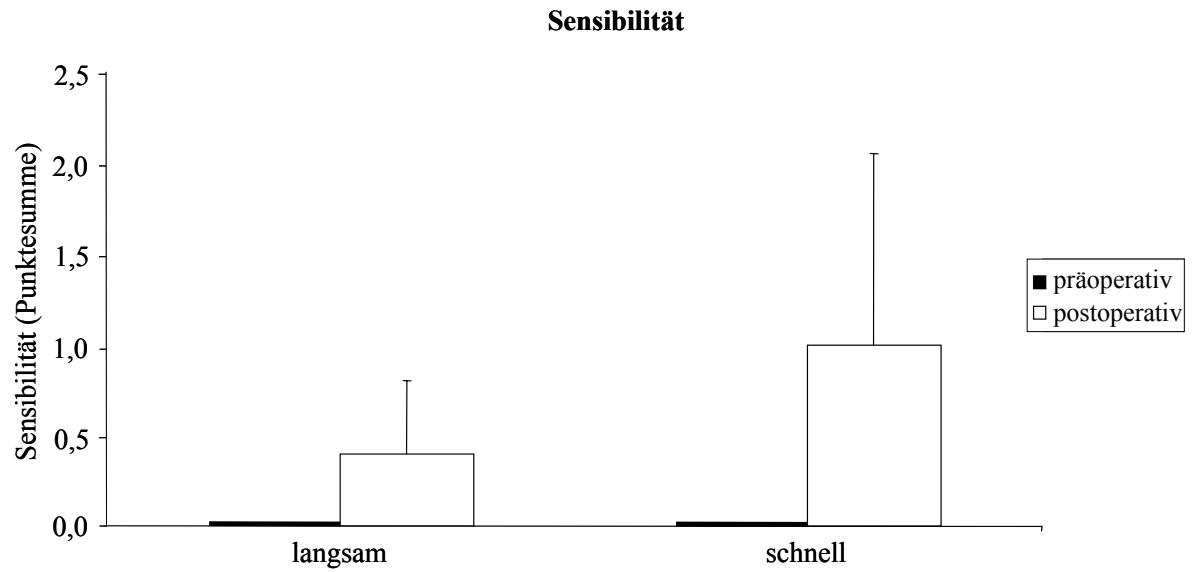


Abbildung 22: Graphische Darstellung der $MW \pm SEM$ der Sensitivität (Punktesumme) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- und postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode.

3.4.3 Inflammationsparameter

Die zerebralen Inflammationsparameter COX-2, I-kB und TNF- α werden postoperativ mit dem Western Blot und NF-kB über immunhistochemische Doppelfärbung bestimmt.

Die Ergebnisse des Western Blots werden in der nachstehenden Tabelle 6 dargestellt. 24 Stunden nach OP können nur noch COX-2 und I-kB, aber nicht mehr TNF- α nachgewiesen werden. Da nur in einzelnen Neuronen konstitutiv TNF- α exprimiert wird, reicht die Menge nicht aus, um sie bei den Nativtieren im Western Blot nachweisen zu können. Deswegen muss an dieser Stelle auf eine Darstellung verzichtet werden.

Die immunhistochemische Messung von NF-kB verlief erfolgreich. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Doppelfärbung sind in Tabelle 7 (S.82) dargestellt.

Tabelle 6: Relative Intensität der Chemilumineszenz für COX-2 und I-kB

Gruppe	COX-2 / β -Aktin	I-kB / β -Aktin	TNF- α
langsam	0,103 (0,076-0,167) *	0,068 (0,021-0,073)	unter der Nachweisgrenze
schnell	0,062 (0,03-0,124)	0,069 (0,017-0,080)	unter der Nachweisgrenze
nativ	0,040 (0,033-0,046)	0,032 (0,025-0,036)	unter der Nachweisgrenze

*Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile der relativen Intensität der Chemilumineszenz für COX-2 und I-kB der zwei Versuchsgruppen und der Nativtiere (je n = 10); Signifikanzen: * = p < 0,05, langsame Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.*

Die **COX-2-Werte** der langsamen Wiedererwärmungsgruppe sind im Vergleich zu der Gruppe der Nativtiere signifikant erhöht. In der Gruppe der schnellen Wiedererwärmung, sind die Werte gegenüber der Gruppe der Nativtiere immer noch erhöht, erreichen aber kein Signifikanzniveau.

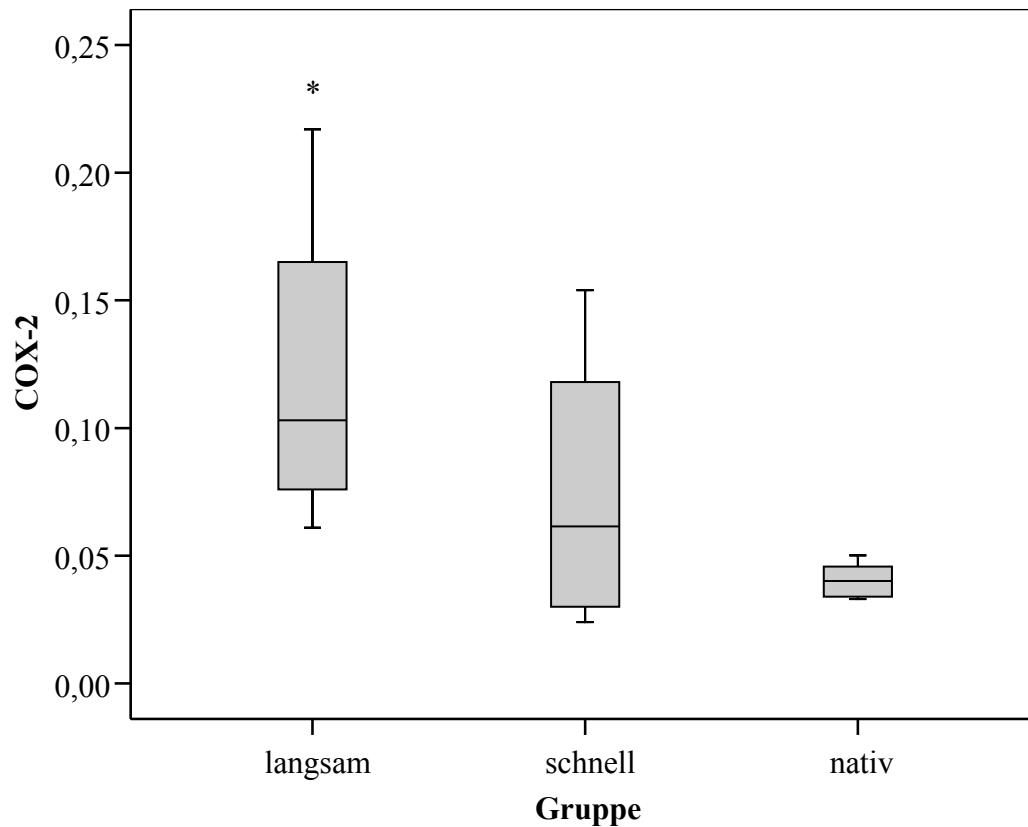


Abbildung 23: Vergleichende graphische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Chemilumineszenz für COX-2 in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je $n = 10$). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der **I-kB**-Analyse. Die I-kB-Werte beider Wiedererwärmungsgruppen sind nahezu gleich. Beide Werte übersteigen den Wert der Nativgruppe, zwischen den Gruppen zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

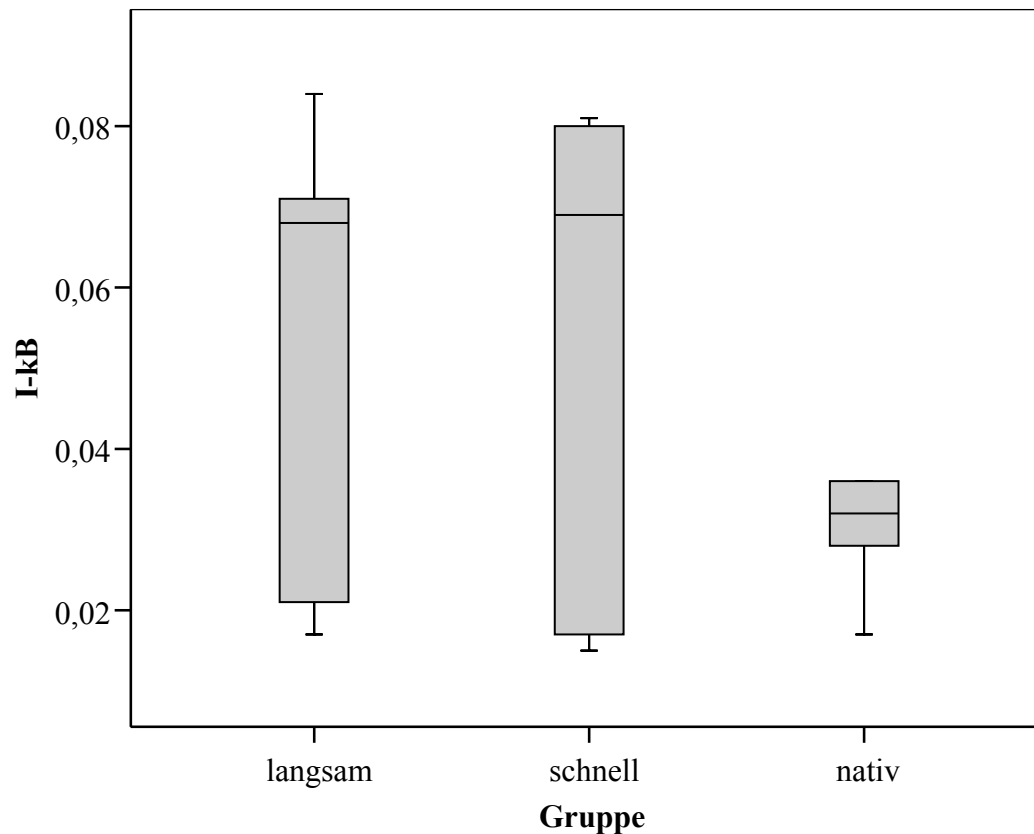


Abbildung 24: Vergleichende graphische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Chemilumineszenz für I-kB in den jeweiligen Versuchsgruppen (je n = 10).

Tabelle 7: Vergleich der Menge doppelt markierter NF-kB-/NeuN positiver Neurone innerhalb der Doppelfärbung (absolut)

Gruppe	NF-kB-/NeuN positive Neurone
langsam	202 (188-233) *
schnell	243 (214-289) *
nativ	86 (69-108)

Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile der Gesamtzellmenge akt. NF-kB-/NeuN-positiver Neurone der zwei Untersuchungsgruppen und der Nativtiere (je n = 10). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

Die Ergebnisse der Doppelfärbung zeigen deutlich, dass Nativtiere nur sehr wenig NF-kB exprimieren im Gegensatz zu den Tieren der anderen beiden Gruppen, die deutlich erhöht sind. Sowohl die Tiere der langsamen Wiedererwärmungsgruppe als auch die Tiere der schnellen Wiedererwärmungsgruppe weisen postoperativ signifikant mehr NF-kB-positive Zellen auf als die Tiere der Nativgruppe. Vergleicht man die beiden Wiedererwärmungsgruppen untereinander, ist kein signifikanter Unterschied feststellbar.

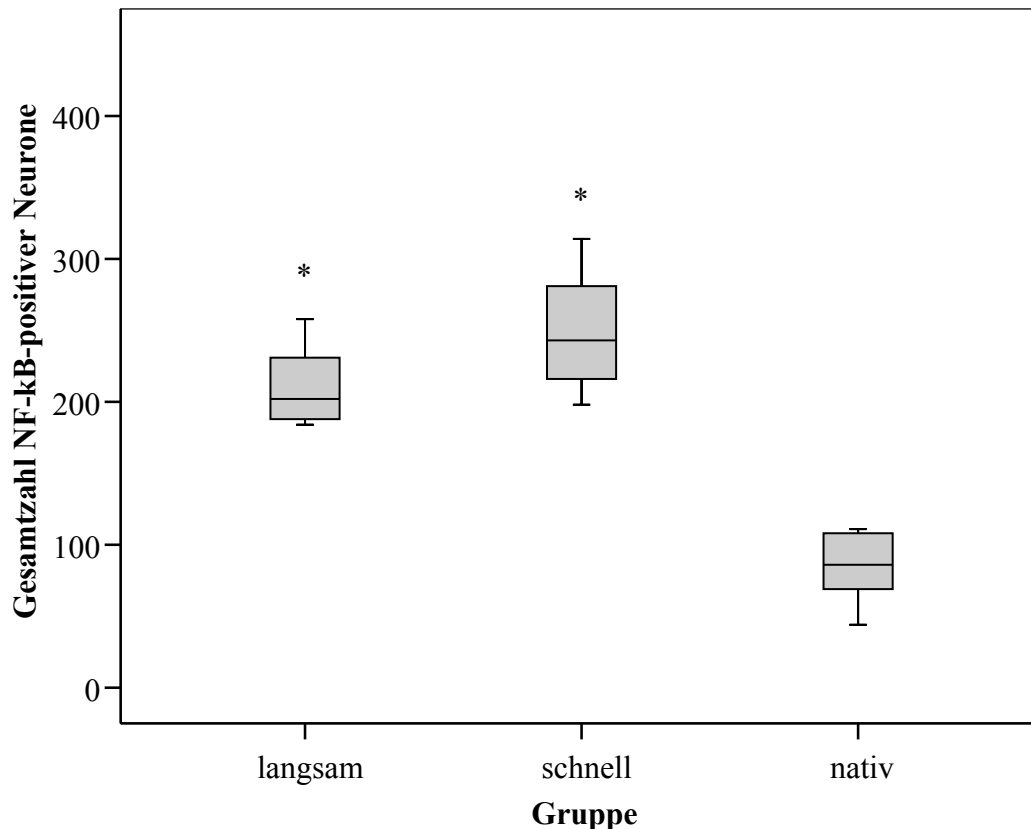


Abbildung 25: Vergleichende graphische Darstellung der Anzahl NF-kB-/NeuN- positiv doppelt markierter Neurone in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je $n = 10$). Signifikanzen: $* = p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

3.4.4 Ergebnisse der HE-Färbung

Die zerebrale Ischämie induziert eine Schädigung der Neurone, die dann mit dem Lichtmikroskop beurteilt werden kann. Dabei werden die folgenden fünf Regionen des Gehirns ausgewertet: Cortex, Gyrus zingului, Striatum, Hippokampus mit Gyrus dentatus und

Kleinhirn betrachtet. Anhand der Differenzierung eosinophiler (rot gefärbter) und basophiler (blau gefärbter) Zellen können die geschädigten Zellen (eosinophil) ausgezählt werden.

Das Ergebnis stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 8: Gesamtzahl der lichtmikroskopisch gezählten eosinophilen Neurone in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je $n = 10$)

Gruppe	Gesamtzahl eosinophil-gefärbter Neurone in den fünf ausgewerteten Regionen
langsam	96 (75-113)*
schnell	185 (162-456)*
nativ	9 (0-44)

*Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile, Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe*

Bei der Auszählung kann ein prominenter Zellschaden vor allem in den Regionen des Striaums, des Motorkortex und des Hippokampus der schnellen Wiedererwärmungsgruppe gefunden werden. Dort sind besonders viele geschädigte Neurone zu sehen. Beide Versuchsgruppen zeigen viele geschädigte, eosinophil-gefärbte Neurone, die sich signifikant zu den Nativtieren unterscheiden. Die Nativtiere zeigen wie erwartet nur sehr vereinzelt eosinophile Neurone in den histologischen Schnitten.

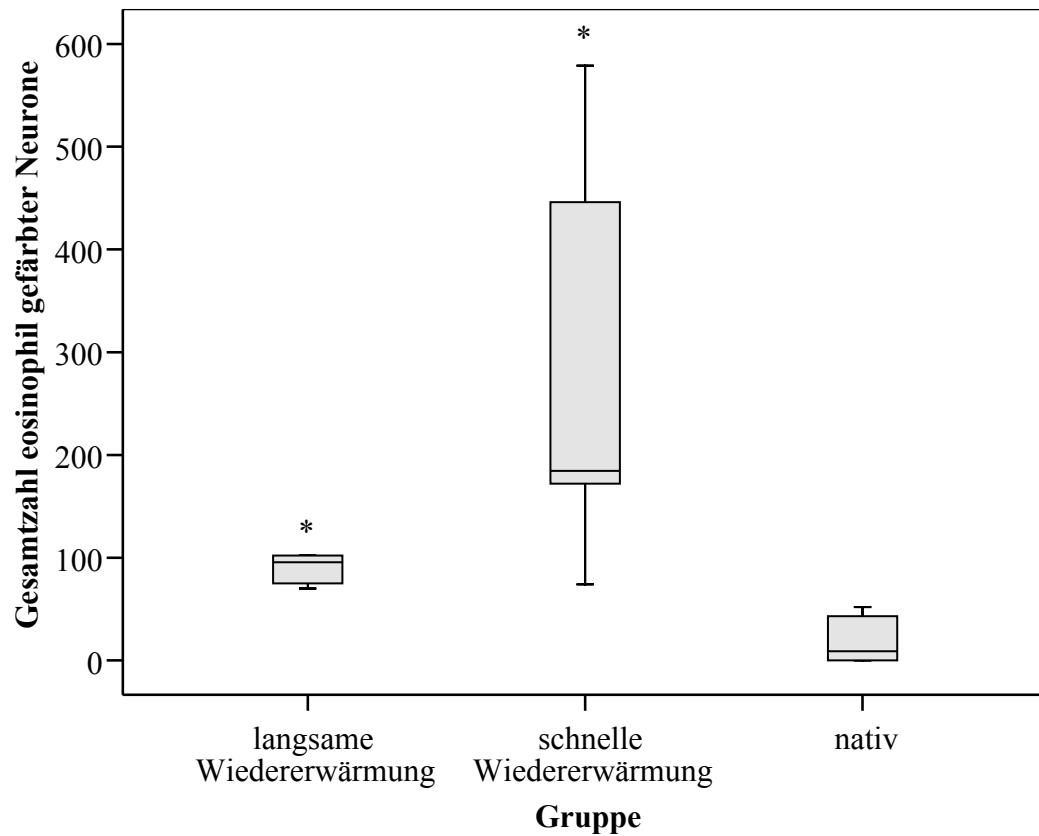


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Gesamtzahl eosinophil gefärbter Neurone via HE-Färbung durch Auszählen der fünf Gehirnregionen aller drei Untersuchungsgruppen (je $n = 10$) erhoben. Signifikanzen: $* = p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.

3.4.5 Bildübersicht HE-Färbung

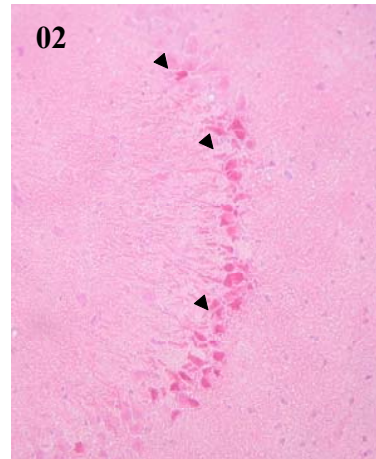
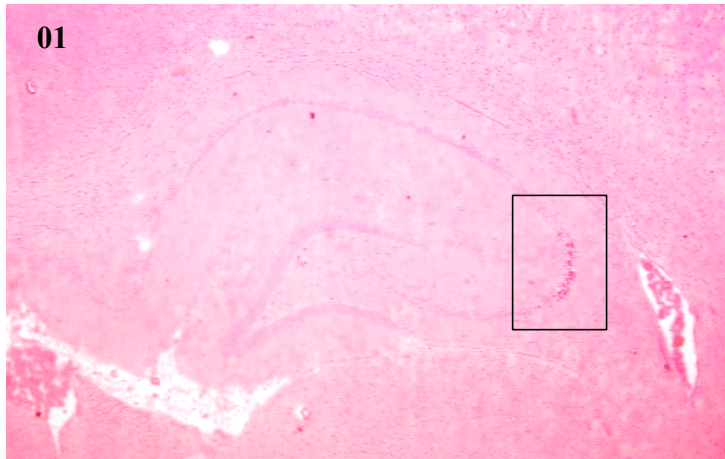
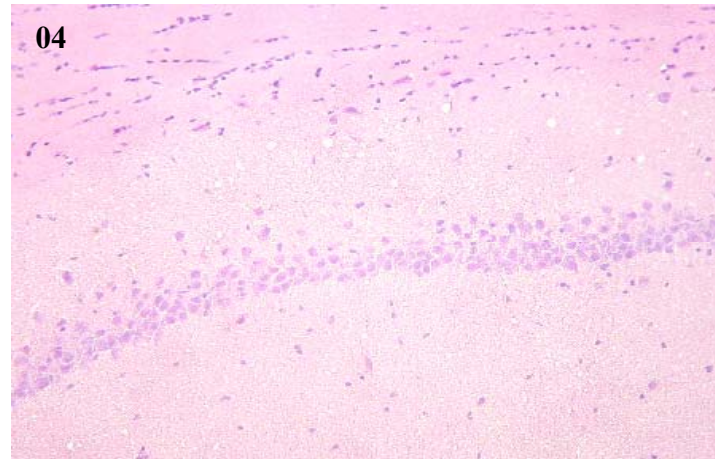
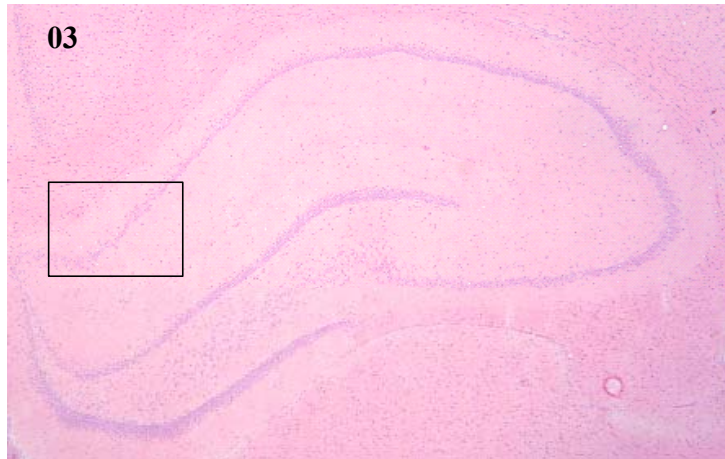


Bild 01 zeigt den rechten Hippokampus mit eosinophil-markierten Zellen in der CA2-Region in 12,5-facher Vergrößerung. Bild 02 zeigt diese Region mit eosinophilen Zellen, markiert durch die schwarzen Pfeile, in 20-facher Vergrößerung. Bild 03 und 04 zeigen den linken Hippokampus einer vitalen CA1-Region in 12,5-facher und 20-facher Vergrößerung. In Bild 04 sind nur ungeschädigte Neurone zu sehen.



3.4.6 Bildübersicht NF-kB-/NeuN-positive Neurone

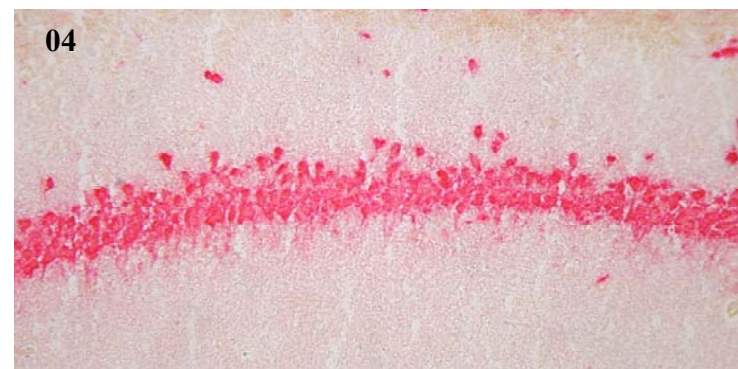
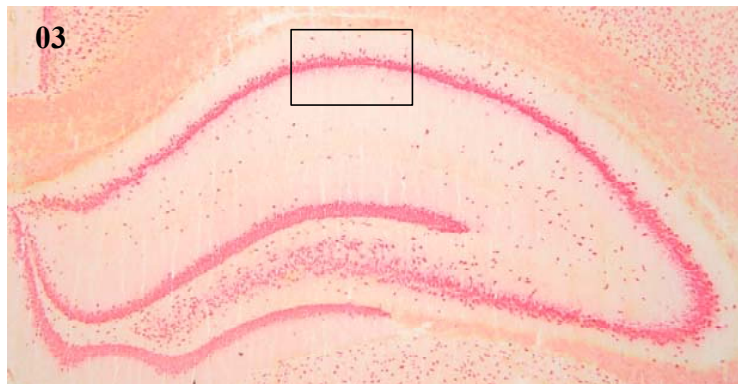
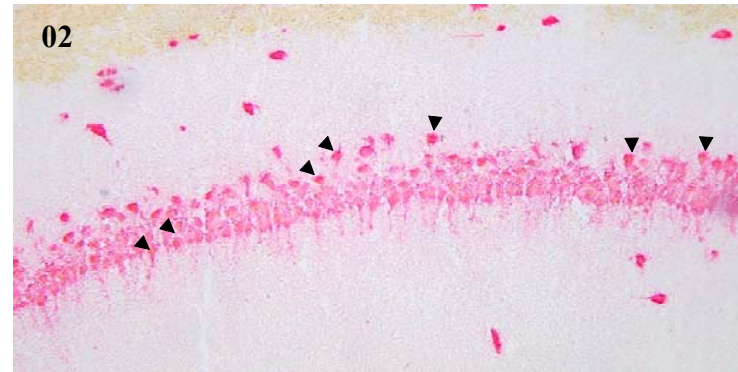
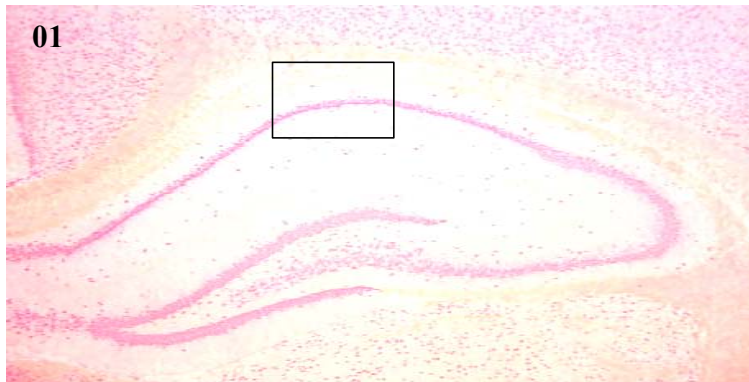


Bild 01 und 02 zeigt in der CA1-Region des Hippokampus doppelt gefärbte Neurone in 12,5 – bzw. 20-facher Vergrößerung. Das neuronale Strukturprotein NeuN stellt sich rot dar, während das gesuchte Protein NF-kB braun markiert ist. In Bild 03 und 04 ist eine CA1-Region des Hippokampus in 12,5 – und 20-facher Vergrößerung dargestellt. Es ist kein braun gefärbtes NF-kB in den rot markierten Neuronen sichtbar.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Beeinträchtigung des funktionellen Outcomes und zerebraler Inflammation nach EKZ mit 45-minütigem tief hypothermen Kreislaufstillstand (DHCA) untersucht.

Das hier verwendete, speziell für die Ratte entwickelte Modell ermöglicht zum einen das Langzeitüberleben der Tiere, zum anderen die Untersuchung zellulärer und molekular-biologischer Mechanismen nach DHCA mit unterschiedlichen Wiedererwärmungsstrategien.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Der tief hypotherme Kreislaufstillstand (DHCA) im Modell

Die EKZ wurde erstmals 1954 durch (GIBBON, 1954) erfolgreich angewendet und ist mittlerweile ein standardisiertes Verfahren, dass vor allem in Verbindung mit DHCA schon bei Kleinkindern mit kongenitalen Herzdefekten durchgeführt wird. Neurokognitive Dysfunktionen sind oftmals Folge dieser Eingriffe und stehen somit im Fokus der Untersuchung der möglichen Pathomechanismen. Erst durch die Entwicklung eines EKZ-Modells mit DHCA bei der Ratte, das mit einem langfristigen Überleben vereinbar ist (JUNGWIRTH et al., 2006), konnte auf bisherige Modelle mit größeren Tieren verzichtet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt mussten die mit DHCA assoziierten Mechanismen an Lämmern (BOKESCH et al., 1996), Ferkeln (MAULT et al., 1993) oder Hunden (WASS et al., 1998b) untersucht werden, was von entscheidendem Nachteil war. Solche Modelle stellen einen enormen Kostenaufwand dar, da mit größeren Tieren der Material- und der Personalaufwand aber auch der Raumbedarf steigt. Oftmals waren diese Modelle auch nicht mit dem längerfristigen Überleben der Tiere vereinbar und spiegeln deshalb nicht die klinischen Standards wieder. Zudem eignen sich Lämmer und Ferkel nur sehr bedingt zur neurologischen Untersuchung. Zum einen gibt es nur wenig standardisierte Tests bei diesen Spezies, zum anderen gestaltet es sich schwierig eine große Untersuchungsichte in einer relativ kleinen Zeitspanne zu erreichen, da der Platzbedarf meist in Konkurrenz dazu steht. Die Ratte hingegen bietet sich besonders als Versuchstier an, da sie unkompliziert in der Zucht

und Haltung ist. Zudem sinkt der Medikamentenbedarf bei diesen kleinen Säugetieren um ein Vielfaches. Die Probenverarbeitung und die spätere Lagerung der Untersuchungsmaterialien sind aufgrund der geringen Größe der Tiere ebenso vereinfacht und kostengünstiger. Gleichzeitig gewährleistet die Inzucht der kleinen Nager eine genetisch relativ homogene Gruppe und damit eine relativ gute Reproduzierbarkeit der Studien. Zudem wurde die Ratte schon in zahlreichen zerebralen Ischämie-Modellen in Bezug auf Histologie und Neurologie untersucht. Hinzu kommt ein Faktor in der ethischen Rangfolge. Die Akzeptanz von Tierversuchen an Heimtieren ist in der Bevölkerung eher gering, so dass gerne auf die Ratte als Labortier zurückgegriffen wird (GINSBERG und BUSTO, 1989).

Das Modell der EKZ mit DHCA ermöglicht erstmals die Untersuchung von zugleich funktionalen, histologischen, aber auch zerebral-inflammatorischen Veränderungen nach zwei verschiedenen Wiedererwärmungsmethoden (langsam und schnell). Dieses basiert auf einem bereits veröffentlichten und verbesserten Modell der kompletten EKZ bei der Ratte (MACKENSEN et al., 2001; JUNGWIRTH et al., 2006). Von entscheidendem Vorteil ist hierbei der verkleinerte Membranoxygenator, der dem Verhältnis von Füllungsvolumen („prime volume“, 10ml) zu dem totalen Blutvolumen der Ratte (25ml) dem des Menschen (2l Füllungsvolumen versus 5l Blutvolumen) gleicht. Vor 30 Jahren lag das Füllungsvolumen solcher Oxygenatoren für ein Kleintier noch bei 100ml mit einem Blutvolumen von 20ml und konnte dann mit einem neu entwickelten Oxygenator auf ein Füllungsvolumen von 25ml reduziert werden (PROCTOR, 1977). Durch die jetzige Reduktion des Füllungsvolumens auf 10ml und die Rückgabe des nach Ende der EKZ im Kreislauf zurückbleibenden Blutes in Form von Erythrozytenkonzentrat kann auf die Verwendung von Spenderblut verzichtet werden. Um eine Volumenüberladung nach EKZ zu verhindern, zentrifugiert man das Restblut. Anschließend wird das erhaltene Erythrozytenkonzentrat mit HES kontrolliert auf einen Hämatokrit von ca. 50% eingestellt, um die Entstehung von Thromben bei der Transfusion zu verhindern. Eine ausreichende Oxygenierung des während der EKZ nicht beatmeten Tieres ist durch den Blutfluss, der ein normales Herzminutenvolumen in der Ratte (160 bis 180 ml \times kg⁻¹ \times min⁻¹) (LI et al., 1998a) während EKZ ermöglicht, gesichert.

Obwohl in diesem Modell der EKZ mit DHCA der Ratte so gut als möglich versucht wurde, klinische Standards zu imitieren, bestehen Einschränkungen. Dieses Modell erlaubt nicht die mediane Sternotomie, die direkte Kanülierung des Herzens und auch keine chirurgische Intervention, da dies nicht mit dem Überleben der Tiere vereinbar wäre.

4.1.2 Neurologische Untersuchung

Die neurologische Untersuchung von Tieren insbesondere von Versuchstieren wie Ratten ist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Dies hängt mit verschiedenen Faktoren zusammen. Da es nur wenige standardisierte Verfahren für die neurologische Untersuchung von Nagern gibt und die Wahrung der Objektivität der untersuchenden Personen ein großes Problem darstellt, wurde in dieser Studie ein bereits standardisiertes Testverfahren verwendet. Zahlreiche Testbatterien (COMBS und D'ALECY, 1987; ZAUSINGER et al., 2000) werden im Rahmen verschiedenster Studien zum Erfassen der neurologischen Funktion bzw. motorischen Fähigkeit herangezogen und dabei teilweise abgewandelt, um bestimmte Tests auszuschließen und andere hinzuzunehmen. Dadurch ist oftmals eine Vergleichbarkeit der Studien nicht möglich. Selbst wenn teilweise einzelne Untersuchungen wie der Beam-Walking-Test in verschiedenen Studien Anwendung finden, so unterscheiden sie sich doch im Aufbau. Es variieren Balkenhöhe, Durchmesser, Länge und Form der Balken (Zylinder- oder Quaderform), aber auch die Dicke der untergelegten Schaumstoffmatte, sowie die zurückzulegende Strecke und nicht zuletzt natürlich die Bewertungsmethode. Solange keine Untersuchungen über den Einfluss der einzelnen Variablen auf die Wertigkeit der neurologischen Untersuchung vorliegen, können solche Fehlerquellen auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Beobachtung und die damit verbundene Bewertung des einzelnen Tieres sind von der untersuchenden Person abhängig und unterliegen somit automatisch einer gewissen Subjektivität. Um diesen Faktor möglichst gering zu halten, werden nur Untersucher mit fundiertem Fachwissen (veterinärmedizinischer Ausbildung) mit dieser Aufgabe betraut und vor Testbeginn hinreichend in die speziellen Testverfahren eingeführt. Weiterhin werden die Untersuchungsgruppen immer von der gleichen Person betreut, so dass die Tiere eine feste Bezugsperson haben und ein Angstverhalten der Tiere damit weitgehend ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Testung der Tiere in der Tagphase und somit der eigentlichen Ruhephase der Ratte dar. Wägt man hier den Nachteil des Tests in der Ruhephase gegen die Vorteile ab, die gute Sichtverhältnisse mit sich bringen, überwiegen hier die Vorteile der guten Lichtverhältnisse. So könnten bei der Testung in Dämmerlicht Reaktionen fehlinterpretiert bzw. falsch oder gar nicht wahrgenommen werden und somit die Ergebnisse des neurologischen Status eines Tieres verzerren. Deshalb ist es opportun, die Untersuchungen unter optimalen Sichtverhältnissen durchzuführen. Um eine gewisse Standardisierung des Verfahrens zu erreichen, werden die Tests immer unter den gleichen Be-

dingungen, zur gleichen Uhrzeit, in der gleichen Reihenfolge von ein und derselben Person durchgeführt.

Der Beam-Walking-Test eignet sich besonders gut um Koordination, Muskelkraft und den Gleichgewichtssinn der Ratte zu prüfen. Bei diesem Test gibt es nur wenige Fehlerquellen, da die Aufgabenstellung relativ einfach ist. Man macht man sich dabei das natürliche Bedürfnis der Ratte zunutze, einer ungewohnten Situation mit Deckungssuche zu begegnen. Das Tier legt also im Idealfall drei Mal die Strecke von 100 cm zurück und wird dabei keinem Zwang (wie z.B. Manipulation durch den Untersucher oder eine bestehende Zeitvorgabe für die Ratte, um die Aufgabe zu bewältigen) ausgesetzt. Der Untersucher setzt vorsichtig die Ratte auf den Balken und bleibt möglichst einige Schritte hinter dem Tier stehen, bis dieses beginnt den Balken zu überqueren. Um zu vermeiden, dass die Ratte sich durch die frontal vor ihr stehende Person bedroht fühlt und die zweite Strecke nicht zurücklegt, folgt man dem Tier in angemessenem Abstand in ruhiger Weise, so dass man sich auch beim Zurücklegen der zweiten Strecke wieder hinter dem Tier befindet. Sollte das Tier jegliche Bewegung verweigern, lässt sich nur schwer beurteilen, ob die Ratte aus Angst oder fehlender Motivation so handelt. Dies setzt eine gute Beobachtungsgabe und Kenntnis des Untersuchers voraus. Konsequenz für die Beurteilung ist dann die Vergabe der vollen Punktzahl und die Angabe der exakten Menge von Fehlritten.

Wie der Beam-Walking-Test lässt der Beam-Balance-Test ebenso Rückschlüsse auf Koordination, Muskelkraft und Gleichgewichtssinn der Ratte zu. Da dieser Test zweimal wiederholt wird, ist es von besonderer Bedeutung für jedes Tier zwischen den Tests eine Erholungsphase einzuhalten. Diese sollte bei jedem Tier die gleiche Zeitspanne umfassen, um für alle die gleichen Bedingungen zu schaffen. Der Test eignet sich besonders, um seitenbetonte Ausfallserscheinungen zu detektieren, die dann wiederum auf motorische oder vestibuläre Störungen hinweisen können. Ein besonderes Augenmerk ist auf Tiere zu legen, die sich nicht auf dem Balken halten können. Dies kann auf mangelnde Kraftreserven durch die Belastung der OP hindeuten oder aber auch auf relevante neurologische Schäden.

Um Stellreflex, Greif- und Gleichgewichtsvermögen zu beurteilen, eignet sich besonders das Rotating-Grid. Wichtig ist, dass bei jedem Tier eine konstante Rotationsgeschwindigkeit eingehalten wird, da das Gitter von einer 0° Position durch eine Drehung erst in eine 90° und zuletzt in eine 180° Position gebracht wird. Dabei sollte der Untersucher immer darauf achten, dass die Drehung nicht zu langsam vollzogen wird, da einige Tiere dazu neigen sich auf dem Gitter fortzubewegen oder vom Gitter zu springen. Eine zu schnelle Drehung (schneller als

eine Sekunde pro 90° Drehung) kann im Gegensatz dazu führen, dass die Reaktionszeit der Ratte zu langsam ist, sie sich dadurch nicht mehr festzuhalten vermag und herunter fällt.

Anhand des Prehensile-Traction Tests (bei dem das Tier mit den Vordergliedmaßen an einem Drahtseil hängen soll, nähere Beschreibung siehe Kapitel 3.2.3.2) kann der Untersucher sowohl das Greif- als auch das Haltevermögen des Tieres beurteilen. Es ermöglicht weiterhin die Begutachtung der Muskelkraft und Bewegungssymmetrie. Eine Monoparese, Hemiparese bis hin zur Plegie kann sofort festgestellt werden, sollte das Tier nur mit einer Gliedmasse nach dem Drahtseil greifen. Differentialdiagnostisch müssen aber Verletzungen, die durch Gruppenmitglieder zugefügt wurden, ausgeschlossen werden. Ein wichtiger Aspekt stellt die Entfernung des Drahtseils zur Schaumstoffmatte dar. So konnte beobachtet werden, dass einige Tiere dazu neigen, sich festzuhalten, um dann nach kurzem Kontakt mit dem Fuß oder Schwanz am Boden vor Ablauf der 15 sec abzuspringen. Um dem vorzubeugen, sollte das Drahtseil so hoch über der Schaumstoffmatte gespannt sein, dass weder Hintergliedmaße noch Schwanzspitze diese berühren. In einigen Studien wird im Zuge des Tests auch die Fähigkeit, eine der Hintergliedmaßen auf das Drahtseil zu bringen, beurteilt (COMBS und D'ALECY, 1987).

Der sensorische Testanteil erfordert die besondere Aufmerksamkeit des Untersuchers gegenüber dem Tier, da bestimmte Kategorien des Tests, wie beispielsweise das Sehen bei der Albino-Ratte, besonders schwer zu beurteilen sind.

Die Eigenwahrnehmung eines Tieres lässt sich mit einem speziellen Propriozeptionstest, der sich sehr einfach und schnell durchführen lässt, bewerten. Dazu wird ein taktiler Reiz mit Finger oder Kugelschreiber kaudal des Rippenbogens gesetzt. Im Idealfall zeigt die Ratte durch Kopfdrehen zur betroffenen Seite die gewünschte Reaktion. Erfolgt keine Reaktion, kann dies verschiedene Gründe haben. Möglicherweise ist der Reiz zu gering dosiert oder das Tier besitzt eine höhere Reizschwelle. Der Untersucher sollte in solch einem Falle durch ein Ausschlussprinzip versuchen, den möglichen Grund für das mangelnde Reaktionsvermögens zu evaluieren.

Im „Response to Vibrissae“-Test wird die Reaktion dieses hoch sensiblen Tastorgans auf äußere Reize geprüft. Vibrissen sind langsam adaptierte Mechanorezeptoren, die als taktil System der Wahrnehmung von Reizänderungen dienen. Diese Sinushaare stellen modifizierte, feste Körperhaare dar, die über einen sog. Follikel-Sinus-Komplex verankert sind. Innerhalb des Blutsinus, wird sowohl das Haar, als auch dessen Follikel frei schwingbar gelagert. Die

Vibrissen sind gekennzeichnet durch eine komplexe Innervation, die durch myelinisierte und nicht myelinisierte Fasern des N. infraorbitalis erfolgt. Diese Fasern enden entweder als freie Nervenendigungen oder als entsprechende Mechanorezeptoren (Merkel-Rezeptoren, lanzettförmige Rezeptoren, Pacinische Körperchen). Dieser spezielle anatomische Aufbau ermöglicht der Ratte eine genaue Wahrnehmung ihrer Umgebung, bei der die Vibrissen als eine Art Navigationshilfe dienen. Setzt man also einen äußeren Reiz durch Vorbeistreichen mit einem Kugelschreiber oder Finger entlang der Vibrissen, sollte die Ratte physiologischer Weise mit einem Zuwenden des Kopfes zur entsprechenden Seite reagieren. Dieser Test wird im Seitenvergleich durchgeführt und entsprechend bewertet.

Eine besondere Schwierigkeit stellt die Untersuchung der Sehfähigkeit dar. So gibt es für Hunde und Katzen die Möglichkeit des Wattebauschttests, um das Sehvermögen zu testen. In der eigenen Studie wurde dieser ebenfalls für die Untersuchung bei der Ratte herangezogen. Hunde und Katzen verfolgen beim Wattebauschttest physiologischer Weise den Flug des Objekts. In der vorliegenden Studie konnte man keinen Unterschied des Sehvermögens zwischen den beiden Gruppen feststellen. Dies könnte aber auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: Einerseits eignet sich der Wattebauschttest zur Evaluierung des Sehvermögens bei der Ratte nur bedingt, da die Ratte nur in sehr seltenen Fällen die gewünschte Reaktion zeigt. Andererseits stellt die Untersuchung des Auges der Albino-Ratte im Allgemeinen ein Problem dar. Dies hängt z.B. damit zusammen, dass die Pupille nur schwer sichtbar ist und weder eine Miosis noch eine Mydriasis nach Pupillenstimulation mit einer Lichtquelle gut erkennbar sind. Gleichzeitig gibt es bisher keine speziell für Ratten entwickelten Augenuntersuchungen. Bei diesem Test besteht folglich hinsichtlich der Entwicklung neuer Methoden und deren Etablierung noch Forschungs- und Handlungsbedarf.

Das Hörvermögen wird über Geräuscherzeugung durch Schnipsen mit den Fingern oder Händeklatschen erzeugt. Anhand des Ohrenspiels wird beurteilt, ob das Tier über ein intaktes Gehör verfügt oder nicht. In dieser Studie gab es keine Schwierigkeiten das für die Ratte typische Ohrenspiel festzustellen. Dennoch kann mit diesem Tests nur festgestellt werden, ob das Tier hört, eine weitere Differenzierung ist nicht möglich. Dies könnte aber von Interesse sein, bedürfte aber der Entwicklung weitergehender Tests.

4.1.3 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ermöglicht die Identifizierung und semi-quantitative Bestimmung von Proteinen. Bei diesem Verfahren bedient man sich der Elektrophorese, anhand derer Proteinmolekülgemische entsprechend ihrer unterschiedlichen Größe und Ladung in Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden können. Für die Elektrophorese ist die Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgel entscheidend, da dieses eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Gewicht und nicht nach Ladungsunterschieden gewährleistet. Wichtig ist auch, dass der Polyacrylamidanteil des Gels entsprechend der Größe des gesuchten Proteins angepasst wird. Je nach Größe des gesuchten Proteins enthält das Gel mehr oder weniger Polyacrylamid. Denn je mehr Polyacrylamid beim Gießen des Gels verwendet wird, umso engmaschiger ist das Gel. Umgekehrt ist ein Gel mit einem geringeren Polyacrylamidanteil weitmaschiger und damit für die Auftrennung größerer Proteine geeignet (siehe Kapitel 3.2.5.1 und Tabelle 2). Des Weiteren muss bei der Elektrophorese sichergestellt werden, dass der Draht mit Flüssigkeit bedeckt ist, da sonst die erzeugte Spannung nicht fließen kann. Da bei der Gelelektrophorese Wärme entsteht und dies zur Überhitzung des Gels führen kann, ist auf eine ausreichende Kühlung zu achten. Dies wird einerseits durch die Wasserkühlung und andererseits durch eine reduzierte Transferzeit bei niedriger Ampere-Zahl gewährleistet. Bei zu starker Erwärmung des Gels, kann es zum Verlust der Stabilität und dem Massenauf Lösungsvermögen kommen, weswegen die Banden verwischen und somit die Auswertung unmöglich wird. Unscharfe Banden können ebenfalls durch eine zu hohe Spannungszahl entstehen. Um eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten, sollte des Weiteren immer eine exakte Probenmenge von 20 µg Protein pipettiert werden. Eine zu gering applizierte Proteinmenge führt zu einer schwachen Signalübertragung beim Western Blot und ist somit nicht oder nur schwer auswertbar.

Der Proteintransfer erfolgt über Puffergesättigte PVDF-Filterpapiere, die mit dem jeweiligen Anoden- bzw. Kathodenpuffer gut durchtränkt sein sollten, um den Proteintransfer nicht zu behindern. Besonders wichtig ist es, die Filterpapiere blasenfrei in die Blotkammern einzulegen, da Luftblasen den Transfer unterbrechen und die fertig entwickelte Membran fleckig erscheinen lassen kann (fehlende Banden). Eine faltenfreie Handhabung der Membran ist Voraussetzung für die Entstehung der möglichst einwandfreien Bilder, da Knicke zu falschpositiven oder falschnegativen Ergebnissen führen können. Wichtig ist auch eine Einhaltung der Transferzeit von zwei Stunden. Denn eine zu lange Transferzeit führt dazu, dass

die Proteine durch die Membran hindurch auf die unten liegenden Filterpapiere transferiert werden und somit verloren gehen.

Wichtig für möglichst klare Hintergrund-arme Western Blotbilder sind sorgfältige Waschgänge mit PBST. Sie gewährleisten eine ausreichende Reduktion des Hintergrunds. Für den Immunoblot ist sowohl die Konzentration des Milchpulvers bzw. des bovinen Serumalbumins als auch die Blockierdauer von Interesse. Im Falle einer zu niedrigen Konzentration oder zu kurzen Blockierdauer können zu viele Banden erscheinen. Bei einer zu langen Blockierdauer wird der Hintergrund zu stark durch zu intensive Absättigung mit dem Blockiermedium. Es werden für alle Membranen Antikörper-abhängig für die 60-minütige Inkubation wird 10 %iges Milchpulver bzw. 10 %iges bovines Serumalbumin verwendet. Um keine falschen Ergebnisse wie zu schwache Signale zu erzielen, ist die Wahl des richtigen Antikörpers ebenso entscheidend wie die Einhaltung der Antikörper-spezifischen Lagerungstemperatur.

Die Inkubationszeit sollte genau dem Protokoll entsprechen, da eine zu kurze Inkubation zu einer zu geringen Proteinmarkierung und eine zu lange Inkubationszeit zu einem zu starken Hintergrund führen. Bei der Entwicklung des Western Blots ist sicher zu stellen, dass die Membran gut mit dem Chemilumineszenz-Reagenz durchfeuchtet ist. Auch hier ist ein blasenfreies Aufbringen der Membran wichtig.

4.1.4 Doppelfärbung aktivierten NF-kB in Kombination mit NeuN

Erwartungsgemäß konnte bei den als Negativkontrolle mitgefärbten Präparaten von gänzlich unbehandelten Tieren nur sehr wenig NF-kB positive Zellen detektiert werden. Da NF-kB in Neuronen, ebenso wie in Endothel- und Gliazellen lokalisiert sein kann (CARROLL et al., 1998) und dann die Expression weiterer inflammatorischer Mediatoren wie pro-inflammatorischer Zytokine, induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) und Adhäsionsmoleküle induziert (PAPARELLA et al., 2002), ist es notwendig einen neuronalen Marker einzusetzen. Da eine vermehrte Aktivität von NF-kB in Neuronen und Gliazellen während neurodegenerativer Prozesse gefunden werden konnte und dies anhand von Studien zum Herzstillstand und zu Schlaganfällen bei Nagern im Gehirngewebe bewiesen werden konnte (MATTSON et al., 2000), liegt es nahe die Aktivität von NF-kB nach einem ischämischen Ereignis, wie der EKZ zu untersuchen. So wird in einer Studie eine Aktivierung von NF-kB in CA1 hippocampalen Neuronen nach einer transienten globalen Ischämie des Vorderhirns bei der Ratte

beobachtet (CLEMENS et al., 1997). Da bisher auch diskutiert wurde, ob NF-kB anti-apoptotische Mechanismen in Bewegung setzt (z.B. das Amyloid precursor protein (APP)) (FURUKAWA et al., 1996) oder durch Unterstützung der Produktion zytotoxischer Substanzen wie Stickoxid (MATTSON et al., 2000) die Apoptose induziert, muss in der vorliegenden Studie ein proapoptotischer Effekt in Erwägung gezogen werden. In der HE-Färbung sind vermehrt eosinophile Zellen sowohl in der Gruppe der schnellen als auch der langsamen Wiedererwärmungsgruppe zu finden. Aus diesem Grund schließt man auf einen Prozess des Zelluntergangs, der möglicherweise durch NF-kB induziert wurde. Auch wenn sich bei der HE-Färbung nicht zwischen Apoptose und Nekrose differenzieren lässt.

4.1.5 Beurteilung des Gewebeschadens anhand der HE-Färbung

Die HE-Färbung findet sowohl in der Histologie, als auch in der Histopathologie vielfach Verwendung und gehört dort zu einem Standardverfahren. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung setzt sich aus zwei Farbstoffen zusammen, aus dem dunkelblauen, basophilen Hämatoxylin und dem roten Eosin. Der Stoffwechsel der Zelle wird durch die Ischämie maßgeblich beeinflusst. So herrscht ein Blutmangel und damit ein Sauerstoff- und Energiemangel, der eine vermehrte Anreicherung von sauren Stoffwechselprodukten in der Zelle zur Folge hat. Diese Zellen färben sich dann in der HE-Färbung eosinophil, rosa-pink an. Zellen, die nicht in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigt sind, färben stattdessen das Hämalaun dunkelblau an. Diese Differenzierung mittels HE-Färbung liefert somit wichtige Informationen über den entstandenen Zellschaden. So kann man die Menge der eosinophilen Zellen absolut und in Bezug auf die verbliebenen basophilen Zellen ermitteln und erhält einen Überblick über die Menge der geschädigten Neurone (LI et al., 1998b).

Allerdings lässt sich mit der HE-Färbung nicht sagen, ob ein apoptotischer oder nekrotischer Zelluntergang vorliegt, oder diese Zellen sich gar wieder erholen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Physiologische Variablen

Wichtige Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Modells, aber auch mit anderen, vergleichbaren Studien, ist eine standardisierte Vorgehensweise, die auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb dieses Modells gewährleistet. Ein konstanter Versuchsablauf kann nur erreicht werden, wenn die notwendigen Messungen regelmäßig und zu immer gleichen Zeitpunkten von demselben Untersucher erfolgen.

Neben der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks wird eine Blutgasanalyse durchgeführt, um Aufschluss über den Gehalt an Hämoglobin, den arteriellen paCO_2 , paO_2 , den pH-Wert des Blutes, den Basenüberschuss (BE), sowie den Kaliumgehalt (K^+) zu erhalten. Essenziell für den Versuchshergang ist die Dokumentation der rektalen, sowie der perikraniellen Temperatur mit Temperatursonden. Die Werte werden allerdings an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

Mittlerer arterieller Blutdruck, MAP (mmHg)

Im Verlauf der Abkühlung kommt es zu einem reduzierten Blutfluss, der wiederum einen erniedrigten Blutdruck nach sich zieht (siehe 3.3.1). Während der Wiedererwärmungsphase wird der Mittlere Blutdruck künstlich mit Norepinephrinhydrochlorid-Gaben über 50 mmHg gehalten, sobald eine rektale Temperatur von über 30 °C erreicht ist (siehe 3.3.1).

Gesamthämoglobin (g/dl)

Vor Beginn der EKZ liegt der Hämoglobinwert in beiden Gruppen bei ca. 14 g/dl, was dem physiologischen Bereich (11,5-16,0 g/dl) der Ratte entspricht. Mit Beginn der EKZ fällt die Hämoglobinkonzentration um ungefähr die Hälfte des ursprünglichen Wertes ab (siehe 3.3.1), da der Protokoll-bedingte Blutentzug sich bei allen Tieren konzentrationsmindernd auswirkt. Das Schlauchsystem der EKZ (Oxygenator, Ab- und Zuleitung) wird, um es zu entlüften, mit 6 % iger Hydroxyethylstärke (HES) gefüllt. Dies führt zu einer Hämodilution, wirkt sich aber mit der sinkenden Temperatur günstig auf die Blutviskosität aus. Jedoch wird der Einsatz von HES und anderen vergleichbaren Produkten kontrovers diskutiert. Die Hämodilution führt zu

einer Abnahme des Plasmaproteinspiegels und der Gerinnungsfaktoren, einer deutlichen Elektrolytimbalance, einer Erhöhung der inflammatorischen Antwort und des kolloidalen osmotischen Drucks, was wiederum begünstigend auf die Entstehung interstitieller Ödeme wirkt (SHIN'OKA et al., 1998; JAGGERS et al., 1999; DUEBENER et al., 2001). So kann in einer prospektiven Studie mit Kindern, die sich einer EKZ unterziehen mussten, ein negativer Effekt eines erniedrigten Hämatokrits (20 % versus 30 %) sowohl auf die perioperativen Ergebnisse als auch auf die neurologischen Entwicklungen nach einem Jahr gezeigt werden (JONAS et al., 2003). Im Zuge der Wiedererwärmung ist der Sauerstoffbedarf v.a. im Gehirn erhöht und das Gehirn somit besonders schadensanfällig infolge einer beeinträchtigten Autoregulation. Es gibt Hinweise, die belegen, dass sich ein höherer Hämatokrit vorteilhaft auf eine systemische Sauerstoffversorgung auswirkt (JAGGERS et al., 1999). Nach Ende der EKZ wird das Blut, das sich noch im Schlauchsystem befindet, gesammelt, aufbereitet und transfundiert, um den postoperativen Hämatokrit auf mindestens 30 % zu erhöhen. Auf Fremdblut als einen möglichen Einflussfaktor kann so in dieser Studie verzichtet werden, was weitgehend dem klinischen Alltag entspricht.

Arterieller Sauerstoffpartialdruck, PaO₂ (mmHg)

Die ausreichende Sauerstoffversorgung wird sichergestellt durch die kontrollierte Beatmung. An der EKZ erfolgt die Sauerstoffversorgung über den Oxygenator bei sistierender Beatmung. Über diesen wird hier eine kontinuierliche und ausreichende Sauerstoffspannung erreicht. Der Abfall der Sauerstoffsättigung gegen Ende der EKZ lässt sich mit einem Nachlassen des Gasaustausches in den Matten des Oxygenators erklären. Sie ist aber immer noch ausreichend.

Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck, PaCO₂ (mmHg)

Der PaCO₂ wird ebenso wie der PaO₂ während des gesamten Versuchs kontinuierlich überwacht und unter Zuhilfenahme von Atemfrequenz- und Atemvolumen-Regulierung konstant in physiologischen Bereichen gehalten. Dies ist wichtig, da ein erniedrigter PaCO₂ neuroprotektive Wirkung haben kann (VANICKY et al., 1992). Eine Einflussnahme auf das Ergebnis ist nach heutigem Kenntnisstand in der vorliegenden Studie auszuschließen, da sich der PaCO₂ bei allen Tieren fortwährend im physiologischen Bereich bewegte.

pH-Wert

In der hier vorliegenden Studie wurde auf ein striktes pH-Management (pH-stat) geachtet. Ausschlaggebend für die Auswahl dieses Regulationsmechanismus waren verschiedene Studien (JONAS et al., 1993; PRIESTLEY et al., 2001), die einen Zusammenhang zwischen verbessertem neurologischen Outcome und der Anwendung der pH-stat-Methode zeigen konnte. Grundlage dieses Schutzmechanismus könnte eine Unterdrückung zerebraler Exzitotoxizität durch bestehende azidotische Verhältnisse sein (KAKU et al., 1993; TOMBAUGH und SAPOLSKY, 1993). In früheren Studien ging man davon aus, dass die Alpha-stat-Methode eine bessere Pufferkapazität und enzymatische Funktion (RAHN et al., 1975), eine Wahrung der Fluss-Metabolismus-Koppelung (MURKIN et al., 1987) und eine Reduzierung der progressiven Gewebeazidose während und nach hypothermen Kreislaufstillstand (WATANABE et al., 1990) verspreche. Dies konnte aber durch eine andere Studie widerlegt werden. Eine Untersuchung von (WONG et al., 1992b) konnte sogar eine auffallende Erhöhung postoperativ auftretender Choreoathetose (Dyskinesie) nach Einsatz der Alpha-stat-Methode feststellen, die unter Umständen mit einem erniedrigten Blutfluss zusammenhängt. Durch den Einsatz der pH-stat-Methode konnte ein besserer Blutfluss gewährleistet werden, der einen positiven Effekt auf die Gewebespersion hatte und letztlich den Temperaturgradienten innerhalb des Gehirns reduzierte. Sowohl Alpha-stat als auch pH-stat beruhen auf der Regulation des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (PaCO_2) während bestehender Hypothermie. Die Alpha-stat-Methode spiegelt den Regulationsmechanismus wechselwarmer bzw. ektothermer Tiere, wie den von Amphibien wieder (HEINEMANN, 2002). Dabei wird konstant ein PaCO_2 -Wert von 40 mmHg bei einer gemessenen Temperatur von 37 °C (unkorrigierte Tempertur) beibehalten (SKARYAK et al., 1995). Bei diesem Modell stehen Temperatur und Wasserstoffionenkonzentration in direkter Beziehung. Mit fallender Temperatur steigt die Sauerstoffbindungskapazität, dadurch steht dem Blut mehr Sauerstoff zur Verfügung und der pH steigt. In vivo besteht eine Hypokapnie und Alkalose oder Basendrift. Dem peripheren Gewebe und dem Gehirn steht weniger Sauerstoff zur Verfügung, da die steigende Sauerstoffaffinität des Hämoglobins den Sauerstofftransport vom Blut zu den zerebralen Mitochondrien verhindert.

Im Gegensatz dazu bedient sich die pH-stat-Methode dem Hypothermieregulationsmechanismus der Winterschläfer (Heterotherme). Hier wird der Zuluft des Oxygenators so lange CO_2 während der Abkühlungsphase zugeführt, bis entsprechend der gemessenen Patiententemperatur (korrigierte Temperatur) ein PaCO_2 -Level von 40 mmHg erreicht wird

(SKARYAK et al., 1995). Es findet also eine Orientierung am Blut-pH statt. Durch Gegenregulation wird konstant ein Blut-pH von 7,4 aufrechterhalten und im Blut entwickelt sich Hyperkapnie und Azidose. Im Gesamtverlauf bewirkt der pH-stat-Mechanismus einen Anstieg des kortikalen Blutflusses und eine erniedrigte Sauerstoffbindungskapazität im Blut. Als Folge davon ist die Hämoglobinkonzentration im Gewebe erhöht, was wiederum in einer Sauerstoffsättigung im Gehirn mündet, da ein vermehrter Sauerstofftransfer zu den zerebralen Mitochondrien stattfindet.

Anhand der pH-stat-Methode wurde in diesem Modell ein weitgehend konstanter pH von ca. 7,4 beibehalten. Mit Beginn der Wiedererwärmung sinkt der pH-Wert in beiden Gruppen auf ca. 7,35. Während des Abkühlens und dem DHCA kommt es durch den reduzierten Blutfluss zu einem verminderten Abtransport saurer Stoffwechselprodukte. Mit Wiedereinsetzen des Blutflusses im Zuge der Wiedererwärmung kommt es durch die Reperfusion des Gewebes zu einem Auswaschen dieser Stoffwechselprodukte und somit zu einem Absinken des pH.

Basenüberschuss (BE (mmol/l))

Das Wesen des tief hypothermen Kreislaufstillstandes (DHCA) ist die Reduktion der Körpertemperatur, um die zerebrale metabolische Aktivität zu reduzieren (GREELEY et al., 1991). Bedingt durch die Reduktion der Körpertemperatur kommt es zu einer Verringerung des zerebralen Blutflusses und des zerebralen Sauerstoffverbrauchs. Letzteres bewirkt einen reduzierten Verbrauch energiereicher Phosphatverbindungen und die Risikosenkung einer intrazellulären Azidose, die für gewöhnlich bei DHCA auftritt (NORWOOD et al., 1979). Die anaerobe Stoffwechsellaage bewirkt eine vermehrte Umwandlung von Glukose zu Laktat, wodurch einerseits der pH-Wert im Blut und andererseits der BE-Wert infolge einer zunehmenden Erschöpfung des Säure-Basen-Puffersystems absinken. In der eigenen Studie fällt der Basenüberschuss infolge der beschriebenen Abläufe gegen Ende der Abkühlungsphase ab. Ein Mangel an Energie und erhöhte Laktatwerte im Gehirn sind laut verschiedener Studien bei Tieren und Kindern mit Neuronendegeneration nach Asphyxie assoziiert (HANRAHAN et al., 1998). Der Basenüberschuss wird wie die anderen Blutgase regelmäßig kontrolliert und wird gegen EKZ-Ende mit Bikarbonat reguliert und über -5 gehalten.

Kalium, K⁺ (mmol/l)

Zum Ende der Abkühlungsphase hin sinken die Werte auf 3,5 mmol/l, was auf die Verdünnung des Blutes mit HES zurückzuführen ist. Danach (post-DHCA und EKZ-Ende) steigen die Werte durch eine einsetzende Hämolyse wieder an.

Blutglukose (mg/dl)

In der hier vorliegenden Studie zeigt sich eine Erhöhung der Glukosewerte, die in der langsamen wesentlich niedriger ausfällt als in der schnellen Wiedererwärmungsgruppe. Dies könnte als Resultat einer Stressreaktion auf den tief hypothermen Kreislaufstillstand zu sehen sein. Im Körper kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung antiinsulinerger Hormone wie Glukagon, Adrenalin, Kortisol und schließlich auch Somatotropes Hormon (STH), die eine Steigerung der Blutglukose-Konzentration nach sich zieht. Hyperglykämie wird mit einem schlechteren neurologischen Ergebnis in Ischämie modellen assoziiert (WARNER et al., 1992; DIETRICH et al., 1993). Als weitere Möglichkeit kann eine durch Kältestress induzierte Aktivierung des peripheren sympathischen Systems diskutiert werden. Periphere (Haut, Rückenmark und Abdominalgegend) und zentrale Rezeptoren (Sitz im vorderen Hypothalamus) liefern dem hinteren Teil des Hypothalamus als Temperaturregulations-Zentrum Information über die Blut- (zentrale Rezeptoren) und Körpertemperatur (periphere Rezeptoren). Bei Abweichungen von der Solltemperatur soll dieser Mechanismus für eine Gegenregulation zu physiologischen Körpertemperaturen sorgen. Bei Kältestress kommt es also zu einer Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems, was wiederum zu einem Anstieg der Katecholamine im Blut führt. Der Anstieg von Katecholaminen im Blut nach Hypothermie konnte sowohl bei Ratten (JONES et al., 1984) als auch beim Menschen (JOHNSON et al., 1977) festgestellt werden. Diese zirkulierenden Katecholamine bewirken dann eine Glykogenolyse mit der damit verbundenen Freisetzung von Leberglykogen. Diese resultiert dann mit einer gleichzeitig reduzierten Glukoseaufnahme in eine Hyperglykämie (STEFFEN, 1988). Hypothetisch könnte die erhöhte Temperatur im Zuge der schnelleren Wiedererwärmung auch zu einer Hyperglykämie führen, ebenso wie Stressreaktionen in Form von postoperativ auftretendem Fieber (PULSINELLI et al., 1982).

4.2.2 Betrachtung des neurologischen Defizits und der Inflammationsparameter COX-2, Ik-B, NF-kB, sowie der Histologie im Kontext des tief hypothermen Kreislaufstillstandes mit Wiedererwärmung

Es zeigt sich, dass die Tiere beider Untersuchungsgruppen postoperativ einen neurologischen Schaden aufweisen. Allerdings weisen die Tiere der langsamen Wiedererwärmungsgruppe tendenziell schlechtere neurologische Ergebnisse (ausgenommen die sensorischen Testergebnisse) auf als die Tiere der schnellen Wiedererwärmungsgruppe. Diese Resultate entsprechen nicht den eigenen Erwartungen, vergleicht man sie mit Ergebnissen anderer Studien.

Zu den großen Errungenschaften der pädiatrischen Herzchirurgie gehört die Anwendung der EKZ mit dem tief hypothermen Kreislaufstillstand. Diese zwei Techniken erlauben zwar die chirurgische Versorgung komplizierter kongenitaler Herzdefekte schon in frühester Kindheit, sind aber limitiert durch postoperativ auftretende neurologische Defizite. Die originäre Technik war vor allem beherrscht von der Gefahr einer zu langen EKZ-Dauer, da die Erforschung der „sicheren Phase“ noch nicht ausreichend fortgeschritten war. Der limitierende Faktor in Bezug auf die Dauer der EKZ stellt somit die ischämische Toleranz dar (MEZROW et al., 1994). Das Gehirn ist das sensitivste Organ für ischämische Schäden, wie sie nach EKZ typischerweise auftreten. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die metabolische Rate eines Organismus. Generell ist die zerebrale metabolische Rate eine der höchsten im Körper (SHIRAKI et al., 1988; WASS et al., 1998a), wenn auch die eines Erwachsenen weit unter der eines Kindes liegt (KENNEDY und SOKOLOFF, 1957). Dieses hoch aktive Organ beansprucht allein bis zu 20% des Sauerstoffbedarfs des gesamten Körpers (SOKOLOFF, 1981). Der hohe Energiebedarf resultiert dabei aus der Bewahrung der zellulären Integrität und der Weiterleitung neuronaler Impulse (MICHENFELDER und THEYE, 1973). Diese Mechanismen sind allerdings durch die Ischämie erheblich beeinträchtigt, da der Sauerstofftransport zum Gehirn reduziert ist und gleichzeitig der zelluläre Sauerstoffbedarf das Angebot übersteigt. Zudem ist die Temperatur des Gehirns im Durchschnitt um 0,5 °C höher als die des restlichen Körpers und somit höher als die Kerntemperatur (HAYWARD und BAKER, 1968; BAKER et al., 1972). Das Gehirn ist durch bessere Perfusionsverhältnisse somit schneller einer Temperaturerhöhung ausgesetzt als andere Organe (SHAABAN ALI et al., 2005). Diesem physiologisch erhöhten Metabolismus kann in kritischen Situationen wie Mangeldurchblutung, EKZ und vermehrt anfallenden Stoffwechselmetaboliten nur mit einer Temperatursenkung begegnet werden, die dann eine Reduktion des zerebralen Metabolismus und damit auch des Sauerstoffbedarfs zur Folge hat

(GREELEY et al., 1991). Durch die Hypothermie wird gleichzeitig eine Ausdehnung der „sicheren Phase der EKZ und des tief hypothermen Kreislaufstillstandes erreicht und die zerebrale Schädigung, wie zahlreiche Modelle lokaler und globaler zerebraler Ischämie zeigen, abgemildert (COOK, 2001).

Die zerebrale Temperatur ist also somit eine kritische, auch für die postoperative Phase entscheidende und von außen nicht erkennbare Größe (COSELLI und LEMAIRE, 2002) und sollte deshalb möglichst genau erfasst werden. COSELLI und LE MAIRE (2002) haben sich intensiv mit der Frage des Temperaturmanagements befasst. Aus praktikablen Gründen favorisieren sie die Vena jugularis interna zur Überwachung der Gehirntemperatur. Da aber Hyperthermie im Kontext mit zerebraler Ischämie sogar nekrotische Prozesse beschleunigen und in einer größeren Infarktzone und einem postoperativ schlechteren neurologischen Ergebnis resultieren kann (COSELLI und LEMAIRE, 2002), soll ein striktes Reglement helfen, Hyperthermie postoperativ zu vermeiden. So sollte für eine erfolgreiche Temperaturmessung nasopharyngeal oder tympanisch ein Zugang über die Vena jugularis interna geschaffen werden. Ein früher Wiedererwärmungsbeginn und eine konstante Wiedererwärmungsrate von weniger als 0,5 °C /min sollen für optimale Bedingungen sorgen. Soweit möglich, sollte der Wärmeaustauscher auf oder unter einer Temperatur von 38 °C zu stellen sein. Sowohl die Perfusat- als auch die Patiententemperatur sollte die 37 °C nicht überschreiten. Der Temperaturgradient zwischen Perfusat und Patient sollte unter 10 °C gehalten werden. Zuletzt sollte bei Erreichen einer Temperatur von 36,5 °C die Wiedererwärmung eingestellt werden.

Oftmals erreichen viele Patienten infolge des sog. „Afterdrop“, der sich nach einer EKZ einstellen kann, die Intensivstation mit Temperaturen von 34 bis 35 °C. Dieser „Afterdrop“ entspricht einem so genannten Rückschlageffekt oder Reboundeffekt der Hypothermie. Das heißt es kommt zu einem stark ausgeprägten Abfallen der Kerntemperatur nach der EKZ. Grund hierfür ist eine inadäquate Umverteilung der Körperwärme auf periphere Körperregionen (RAJEK et al., 2000). Diese Umverteilung kann beim Patienten zu einem Schüttelfrost-induzierten erhöhten Sauerstoffverbrauch, Arrhythmien und einem Anstieg des peripheren vaskulären Widerstands führen (CALDWELL et al., 1981). Dies lässt sich durch den Einsatz von warmen Luftmänteln, die die langsame Wiedererwärmungsphase verlängern sollen, vermeiden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass eine Endtemperatur von 35,5 °C bei Kindern nicht überschritten wird.

In der vorgelegten Studie wurde versucht, diesem Reglement weitgehend zu entsprechen. Während der gesamten OP wurde die perikranielle und rektale Temperatur überwacht. Auf die Temperaturmessung über die V. jugularis interna wurde in dieser Studie verzichtet, da die Erfassung der zerebralen Temperatur über eine Temperatursonde im rechten Musculus temporalis erfolgt. Wiedererwärmungsbeginn ist durch das gewählte Protokoll vordefiniert, so dass mit einer Flussrate von 80 bis 90 ml/kg/min die Wiedererwärmung in beiden Gruppen eingeleitet wird. Die Vorgehensweise der langsamen Wiedererwärmungsgruppe unterscheidet sich von der der schnellen Wiedererwärmungsgruppe hinsichtlich Temperaturmanagement und Dauer der Wiedererwärmung. Der Wärmetauscher des Oxygenators, sowie die Wärmematte werden in der langsamen Wiedererwärmungsgruppe auf eine Temperatur von 38,5 °C gebracht und eine Wiedererwärmungsrate von 1 °C/min in den ersten 20 Minuten, in den darauf folgenden 10 Minuten ein Wiedererwärmungsrate von 0,5 °C/min beibehalten, um dann gegen Ende eine Rate von 0,1 °C/min zu erreichen. Die Endtemperatur liegt bei 35,5 °C. Die Empfehlungen bezüglich des Wärmetauschers wurden mit einer geringgradigen Temperaturabweichung um 0,5 °C befolgt, ebenso wie die einzuhaltende Endtemperatur von 36,5 °C (in diesem Protokoll ist sie um 1 °C erniedrigt). Obwohl die Wiedererwärmung stufenweise angeordnet ist und zu Beginn mit 1 °C/min Wiedererwärmungsrate über der empfohlenen Rate liegt, schlägt sich dieser Effekt offensichtlich nicht im neurologischen Outcome nieder. Zwar sind die Ratten der schnellen Wiedererwärmungsgruppe postoperativ tendenziell etwas schlechter als die Gruppe der langsamen Wiedererwärmung, ein Signifikanz-Niveau wird allerdings nie erreicht. Dieser Unterschied muss auch nicht zwingend mit der beschriebenen Vorgehensweise in diesem Modell zusammenhängen, sondern kann andere Ursachen haben. Die schnelle Wiedererwärmung wird wie bereits beschrieben eingeleitet, jedoch werden Wärmetauscher und Wärmematte bei einer Temperatur von 60 °C eingestellt, was zu einer schnelleren Temperaturerhöhung führt. Weder übersteigt die Temperaturerhöhung eine Rate von 1 °C/min, noch übersteigt die Bluterwärmung die 40 °C. Die Endtemperatur von 35,5 °C wird mit der angewandten Methode innerhalb von 20 Minuten erreicht. Obwohl in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen schneller Wiedererwärmung, zu hohen Spitzentemperaturen und schlechterem neurologischen Outcome festgestellt wurde (CROUGHWELL et al., 1994; GRIGORE et al., 2002; NUSSMEIER, 2005) und diese Ergebnisse auch in der eigenen Studie zunächst auch erwartet wurden, konnte man diesen Zusammenhang nicht bestätigen. So konnten (NEWMAN et al., 1995) in ihrer Studie zeigen, dass die Wiedererwärmungsrate nicht als primäre Ursache für ein verschlechtertes neurologisches Outcome zu sehen ist. In der eigenen Studie vermutet man, dass die gewählte

Zeitdifferenz zwischen langsamer und schneller Wiedererwärmung von nur 20 Minuten möglicherweise zu gering ist. Somit konnten keine größeren Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen hinsichtlich Neurologie, Histologie und Inflammation festgestellt werden. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Ergebnisse könnte die für beide Gruppen gewählte Endtemperatur von 35,5 °C sein. Diese begründet sich aus der Anlehnung an das bereits beschriebene in der Klinik angewandte Reglement, um postoperativ auftretende Hyperthermie zu vermeiden. Da aber zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der Ausprägung der Inflammation, sowie der neurologischen Defizite erkennbar wird, muss man in Betracht ziehen, dass die gewählte Endtemperatur hierbei keine bedeutende Rolle spielt.

Verschiedene Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass die Operation am Herzen, sowie die EKZ eine Aktivierung der systemischen Inflammation bedingen und als Folge klinisch zu systemischer Vasodilatation, Hyperthermie, postoperativen Blutungen und einem Reperfusionssinsult des betroffenen Gewebes führen (BAKER et al., 1972; WASS et al., 1995). Gleichzeitig vermutet man, dass der Auslöser zerebraler Hyperthermie ein Anstieg endogener Pyrogene, wie z.B. Zytokine sind (BISSONNETTE et al., 2000). SMINIA und Kollegen (1994) konnten eine Sensitivität des zentralen Nervensystems auf Hitze zeigen und SHUMTIM et al., 1998 anhand eines Modells am Schwein, dass zerebrale Hyperthermie (40 °C) zu neurologischen Defiziten nach Ischämie führt. Auch in der Histologie zeigt sich, dass eine induzierte Hyperthermie (40 °C) innerhalb von sechs Stunden bereits im zerebralen Kortex prominente Veränderungen in den Neuronen hervorruft (SMINIA et al., 1994). In den eigenen Untersuchungen kann dies anhand der histologischen Ergebnisse nur bestätigt werden. Die Anzahl der durch HE-Färbung erfassten eosinophilen Zellen weist nach beiden Wiedererwärmungsstrategien einen deutlichen Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Nativtieren auf. Interessanterweise zeigt dabei die Gruppe der schnellen Wiedererwärmung insgesamt mehr eosinophile Neurone als die Gruppe der langsamen Wiedererwärmung. Dieses Ergebnis hat insofern überrascht als nach den Ergebnissen der Neurologie in beiden Gruppen ähnliche Resultate zu erwarten waren. Die Tatsache, dass eine große Anzahl geschädigter Neurone in den untersuchten Hirnregionen zu finden war, gibt Hinweis auf eine Schadenswirkung durch EKZ mit DHCA, die unter Umständen Folge einer vorangegangenen Zytokinausschüttung in der Peripherie ist oder aber auf einer erhöhten Kerntemperatur beruht. Jede Erhöhung der Kerntemperatur um 1 °C hat eine Erhöhung der metabolischen Rate um 13 % zur Folge (HOLTZCLAW, 1992).

Interessant erscheint auch der Zusammenhang zwischen Hyperthermie und dem Anstieg exzitatorischer Aminosäuren. Bereits ab der Geburt verfügt jedes Kind über exzitatorische Aminosäurenrezeptoren, die innerhalb der ersten Lebenswochen drastisch zunehmen (MCDONALD und JOHNSTON, 1990). So entspricht die Menge der exzitatorischen Aminosäuren eines Kindes ungefähr der Konzentration eines Erwachsenen. Das Auftreten von Krämpfen wird mit der Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren in Verbindung gebracht, die über exzitatorische Mechanismen eine neuronale Schädigung hervorrufen (NEWBURGER et al., 1993). Zerebrale Hyperthermie von 40 °C soll so zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration bei Katzen führen (TAGUCHI et al., 1995). Dieser Zusammenhang konnte auch anhand von Astrozytenzellkulturen bewiesen werden, die während und nach Wiedererwärmung einer anhaltenden moderaten Temperatur von 38,5 °C ausgesetzt wurden und einen extrazellulären Glutamatanstieg aufwiesen (BISSONNETTE et al., 1999).

Mit dem Ergebnis der HE-Färbung korreliert das Resultat der Doppelfärbung. So konnten sowohl in der langsamen als auch der schnellen Wiedererwärmungsgruppe 24h postoperativ signifikant mehr NF-kB positive Zellen gefunden werden als in der Gruppe der unbehandelten Nativtiere. Im Zusammenhang mit akuten neurodegenerativen Prozessen, wie auch mit chronischen alterungsbedingten neurodegenerativen Erkrankungen berichten zahlreiche Studien von einem Anstieg der NF-kB Aktivität in Neuronen und Gliazellen. So ist vermehrt NF-kB im Gehirngewebe von Tieren im Rahmen von Schlaganfall und Kreislaufstillstandexperimenten nachgewiesen worden (YANG et al., 1995; CLEMENS et al., 1997; GABRIEL et al., 1999). Allerdings berichten viele der Studien davon, dass eine NF-kB Bindungsaktivität 24h postoperativ noch nicht bzw. nicht mehr messbar war (SALMINEN et al., 1995; GABRIEL et al., 1999). Verschiedene Mechanismen der Aktivierung von NF-kB in Neuronen sind denkbar. Zum einen sollen eine Aktivierung der Glutamatrezeptoren und die Depolarisation der Membranen in vitro in einer Aktivierung von NF-kB in hippokampalen Pyramidenzellen und zerebralen Granulazellen resultieren (GUERRINI et al., 1995; KALTSCHMIDT et al., 1995), was ein möglicher Mechanismus auch in der vorliegenden Studie sein könnte. Allerdings kann man diese Überlegung nicht anhand von postoperativ auftretenden Krämpfen der Tiere bestätigen oder anhand von Messungen der Glutamatkonzentrationen im Gehirn untermauern. Ebenso zieht man eine ähnliche Aktivierung von NF-kB wie in der Peripherie durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 und TNF- α in Betracht (MOYNAGH et al., 1993). Die NF-kB Untereinheiten p50 und Rel-A konnten im Nukleus von Neuronen des Kortex und Hippokampus entdeckt werden (KALTSCHMIDT et

al., 1994). Die Menge von aktivem NF- κ B scheint in Abhängigkeit von Entwicklung und synaptischer Aktivität zu stehen. So soll entscheidend für die Expression von NF- κ B das Alter der Tiere sein. Während der postnatalen Periode konnten steigende Werte im Zerebellum der Ratte festgestellt werden, die dann später wieder sanken (KALTSCHMIDT et al., 1995). In der eigenen Studie wurden stets Ratten gleichen Alters verwendet, so dass dieser Faktor keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Im Rahmen der synaptischen Übertragung soll NF- κ B Anteil an der Regulierung der Expression von COX-2-Genen in Neuronen haben. Eine konstitutive Expression von COX-2 wird durch synaptische Aktivität reguliert (YAMAGATA et al., 1993) und ist mit aktivem NF- κ B im Nukleus von Neuronen des Hippokampus und Kortex vergesellschaftet. Diese Beweiskette legt eine Regulation von COX-2 durch NF- κ B nahe (O'NEILL und KALTSCHMIDT, 1997), zumal in den eigenen Untersuchungen auch durch Western Blot vermehrt I κ B nachgewiesen wurde, welches erst durch Phosphorylierung in aktives NF- κ B umgewandelt wird. Neben dem vermehrten Auftreten NF- κ B aktiver Neurone, die über Doppelfärbung nachgewiesen werden konnten, zeigt sich auch vermehrt COX-2 im Western Blot beider Wiedererwärmungsgruppen. Allerdings sind die COX-2 Werte der langsamen Wiedererwärmungsgruppe höher als die erreichten Werte der schnellen Wiedererwärmungsgruppe. Dennoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar. COX-2 kann zwar den Zelltod induzieren, dennoch ist eine vermehrte Expression nicht automatisch mit dem Untergang der Zelle assoziiert. Ob ein Zelltod eintritt, hängt u.a. von der Schwere der Ischämie und der Expression von „death-regulatory proteins“ ab. In verschiedenen Studien konnte ein COX-2 Anstieg innerhalb von 24h nach ischämischen Prozessen beobachtet werden, der dann aber in einem Absinken zu Basalwerten resultierte. Hypothetisch betrachtet, könnte durch eine schnellere Wiedererwärmung wie in der vorliegenden Studie schneller der Höhepunkt der COX-2 Werte erreicht und somit auch ein früherer Abfall des COX-2-Spiegels induziert werden. Dies könnte erklären, warum in der langsameren Wiedererwärmungsgruppe geringgradig mehr COX-2 messbar war.

TNF- α konnte entgegen den eigenen Erwartungen weder in der langsamen noch in der schnellen Wiedererwärmungsgruppe gemessen werden. TNF- α wird als einer der ersten Mediatoren als Antwort auf ein Entzündungsgeschehen freigesetzt (DENIZOT et al., 1998; SASON-TON et al., 2002), so dass möglicherweise zum Zeitpunkt der Analyse 24 Stunden post OP bereits keine im Western Blot detektierbare Menge TNF- α mehr vorhanden war. Die mangelnde Spezifität des Antikörpers konnte durch den Einsatz einer Positivkontrolle ausgeschlossen werden.

4.2.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Mit dieser Studie gelang erstmalig eine vergleichende Betrachtung von neurologischem Outcome und zerebraler Inflammation nach zwei verschiedenen Wiedererwärmungsmethoden an einem Rattenmodell des tief hypothermen Kreislaufstillstandes. Besonderes Interesse galt der Untersuchung der Zusammenhänge zerebraler Inflamationsprozesse und der Wiedererwärmung. Im Gegensatz zu anderen Studien und bisherigen Empfehlungen war am ersten postoperativen Tag nach EKZ kein Unterschied des neurologischen Ergebnisses nach schneller im Vergleich zur langsamen Wiedererwärmung feststellbar. Das Ergebnis der Neurologie spiegelt allerdings nicht die erhobenen Resultate der Histologie, der Immunhistochemie und des Western Blots wieder. So ist die Gesamtzahl der eosinophil gefärbten Neurone nach schneller Wiedererwärmung im Vergleich zu den Nativtieren signifikant erhöht, ebenso wie die Menge NF-kB-positiver Neurone. Verglichen mit den Nativtieren zeigen auch die Inflamationsparameter I-kB und COX-2 einen deutlichen Anstieg im Western Blot. Eine schnelle Wiedererwärmung führt zu einer Verkürzung der EKZ-Dauer sowie der Gesamt-OP-Zeit und kann so möglicherweise zu einem besseren neurologischen Outcome beitragen. Es ist allerdings einzuräumen, dass dieses Modell lediglich eine Momentaufnahme der ersten 24 Stunden nach EKZ mit DHCA darstellt. Weitere Untersuchungen über einen längeren postoperativen Zeitraum sollten angestrebt werden, um die Auswirkungen der schnellen im Vergleich zu einer langsamen Wiedererwärmung auf neurologisches Outcome sowie zerebrale Inflammation längerfristig zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

„Neurologische Defizite und zerebrale Inflammation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand der Ratte: Einfluss der Wiedererwärmungsgeschwindigkeit“

In einem Zeitalter großen medizinischen Fortschritts gehören kongenitale Herzdefekte trotz routinemäßiger Anwendung der Extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) zu den chirurgischen Herausforderungen. Da die Inzidenz neurologischer Defizite nach herzchirurgischen Eingriffen dennoch hoch ist, wird dieser mit EKZ und DHCA assoziierten Morbidität vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Im Fokus heutiger wissenschaftlicher Forschung stehen in diesem Zusammenhang die mit DHCA notwendige Wiedererwärmung und etwaige zerebrale Entzündungsreaktionen.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Wiedererwärmungsrate und –dauer auf die neurologische Funktion, die zerebrale Inflammation, sowie die Histologie in einem kliniknahen Modell der EKZ mit DHCA an der Ratte zu untersuchen. 20 männliche Sprague-Dawley Ratten (330 bis 390 g) wurden anästhesiert, intubiert und mit 2 bis 2,5 Vol % Isofluran in ca. 40 % Sauerstoff beatmet. Danach kanülierte man folgende Gefäße: die A. sacralis mediana, für den Anschluss an die EKZ, zur Rückgabe oxygenierten Blutes, der Blutentnahme und der Medikamentenapplikation, die A. epigastrica superficialis zur Blutdruckmessung, sowie die V. jugularis externa dextra und V. cava cranialis zur venösen Drainage während der EKZ. In der darauf-folgenden Abkühlungsphase wurde die Anästhesie mit 0,8 bis 1 Vol % Isofluran aufrecht-erhalten. Um eine Analgesie zu gewährleisten, erhielten die Tiere repetitiv Fentanyl (5 µg Boli) und zur Relaxation 1,6 mg/h Cisatracurium. In dieser Phase kühlte man die Tiere mit Hilfe von Kühlmatten, Eisbeuteln und dem Wärmetauscher der EKZ innerhalb von 30 Minuten auf eine rektale Temperatur von 15 bis 18 °C. Mit Erreichen dieser Körpertemperatur wurde die EKZ beendet. Während des 45 minütigen, tief hypothermen Kreislaufstillstandes stellte man die Beatmung, sowie die Anästhesie ein.

Die Tiere wurden randomisiert in zwei Wiedererwärmungsgruppen (n = 10) eingeteilt. Während die eine Gruppe langsam (40 Minuten) wiedererwärmt wurde, erwärmte man die andere Gruppe innerhalb von 20 Minuten (schnell) auf eine rektale Temperatur von 35,5 °C. Die Anästhesie erfolgte analog der Abkühlungsphase. Nach Ende der EKZ führte man die Beatmung noch für 1 Stunde weiter. In dieser Zeit retransfundierte man die Tiere mit Erythrozytenkonzentrat (bestehend aus abzentrifugierten Restblut aus der Herz-Lungen-Maschine, versetzt mit Hydroxyethylstärke und Calcium, Hämatokrit > 50%, um den Hämatokrit der Tiere über 30 % zu haben). Die Ratten wurden sowohl präoperativ (1 Tag vor OP) als auch postoperativ am nächsten Tag neurologisch untersucht und 24 Stunden nach erfolgter OP getötet. Die Hirne wurden *in toto* entnommen, eingefroren und histologisch mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Immunhistochemie untersucht, um die Menge eosinophiler Zellen und die Menge NF-kB positiver Neurone zu ermitteln.

Die Inflamationsparameter TNF- α , COX-2 und I-kB untersuchte man mit Western Blot. Die vorliegende Studie konnte erstmalig vergleichend das neurologische Outcome nach zwei verschiedenen Wiedererwärmungsstrategien nach EKZ mit tief hypothermen Kreislaufstillstand an einem kliniknahen Modell an der Ratte zeigen.

Entgegen den eigenen Erwartungen konnte ein besseres neurologisches Ergebnis nach schneller Wiedererwärmung im Vergleich zur langsamen Wiedererwärmung festgestellt werden. Dennoch zeigte sich in den Ergebnissen der Histologie, der Doppelfärbung und des Western Blots eine vermehrte Schädigung der Neurone, sowie eine Erhöhung der Inflamationsparameter nach schneller Wiedererwärmung. Die Pathomechanismen der zerebralen Inflammation nach DHCA, sowie der Einfluss der Reperfusion auf das neurologische

Outcome und die komplexe Interaktion zwischen Wiedererwärmung, Reperfusion und inflammatorischer Prozesse im Gehirn bedürfen weiteren Studien.

6 Summary

„Investigation of neurologic outcome and cerebral inflammation after deep hypothermic circulatory arrest in the rat: The impact of the rewarming rate”

Despite considerable progress in medicine, and the adapt use of CPB with DHCA, congenital heart defects are still considered a challenge for surgery. Today's scientific research focuses on CPB with DHCA and the possible cerebral inflammatory reaction, contributing to the often adverse neurologic and neurocognitive outcome following CPB with DHCA. Aim of this study is to investigate the impact of the rate and duration of rewarming have on postoperative neurologic function, histologic outcome and cerebral inflammatory reaction in a clinically relevant animal model of CPB with 45 min of DHCA in the rat. 20 male Sprague Dawley rats (330 – 390 g) were anaesthetized, endotracheally intubated and ventilated with 2 to 2.5 Vol % Isoflurane in 40 Vol % O₂. For pain management all animals received repetitive 5µg boli of Fentanyl. Animals were surgically cannulated as follows: the A. sacralis mediana for arterial inflow during CPB, the taking of blood samples and drug administration. The A. epigastrica superficialis for blood pressure monitoring and the V. jugularis externa and V. cava cranialis for venous drainage during CPB. During the cooling phase anaesthesia was maintained with 0.8 to 1 Vol % Isoflurane and Cisatracurium was given additionally for muscle relaxation (1,6mg/h). To cool rats down to a rectal temperature of 15 – 18 °C within 30 min, cooling blankets, ice bags and a heat exchanger in the oxygenator were used. At 15 – 18 °C, CPB and anaesthesia were terminated for 45 minutes and the venous drainage was opened every ten minutes to allow the animals to exsanguinate to prevent a right heart dilatation. Rats were then randomly assigned to one of two rewarming groups (n = 10): with reinstitution of CPB and anaesthesia, one group was rewarmed slowly over 40 minutes and a second group fast over 20 minutes back to a rectal temperature of 35.5 °C. When reaching 35.5 °C, animals were weaned from CPB, and anaesthesia was maintained for one hour following CPB. During that time the blood left in the circuit was collected, centrifuged, adjusted with HES and calcium to a hematocrit below 50% and returned to raise the animal's hematocrit above 30%. Anaesthesia was terminated one hour following CPB. Animals were extubated when showing sufficient spontaneous breathing and allowed to recover under observation in an oxygen enriched environment. Rats were neurologically tested one day prior to CPB with DHCA as well as on the postoperative day. 24 hours following the end of CPB, animals were sacrificed, their brains removed and deep frozen (-70 °C) for further analysis. H&E staining was performed using slices taken at bregma -0.3 and -3.3 to investigate the histological damage in the Gyrus cinguli, Striatum, motor cortex, Hippocampus and Vermis. NF-kB-positive neurons were labelled with an immunohistochemical double staining and counted using light microscopy. Inflammatory parameters TNF- α , COX-2 and I-kB were evaluated using Western Blotting. For the first time this study compares the neurologic outcome following two different rewarming protocols after DHCA in a clinically relevant animal model of CPB with DHCA. Unexpectedly, a better neurologic outcome is seen after fast rewarming. Although results for histology and immunohistochemistry show higher amounts of eosinophilic and NF-kB- positive neurons in this group. Western Blot also shows increased levels of inflammatory parameters COX-2 and I-kB in the fast rewarming group. These findings suggest that the rewarming rate alone is not the chief cause for an adverse neurological outcome after CPB with DHCA. Further studies concerning the mechanisms leading to adverse neurologic outcome and cerebral inflammatory reaction following CPB with DHCA are required.

7 Literaturverzeichnis

AGGARWAL BB

Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword
Nat Rev Immunol 2003; 3:745-56

AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T

Interleukin-6 in biology and medicine
Adv Immunol 1993; 54:1-78

ALDEA GS, SOLTOW LO, CHANDLER WL, TRIGGS CM, VOCELKA CR, CROCKETT GI, SHIN YT, CURTIS WE, VERRIER ED

Limitation of thrombin generation, platelet activation, and inflammation by elimination of cardiomy suction in patients undergoing coronary artery bypass grafting treated with heparin-bonded circuits
J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 123:742-55

AMIR G, RAMAMOORTHY C, RIEMER RK, REDDY VM, HANLEY FL

Neonatal brain protection and deep hypothermic circulatory arrest: pathophysiology of ischemic neuronal injury and protective strategies
Ann Thorac Surg 2005; 80:1955-64

ANGGARD E, SAMUELSSON B

Biosynthesis of prostaglandins from arachidonic acid in guinea pig lung. Prostaglandins and related factors. 38
J Biol Chem 1965; 240:3518-21

ANKARCRONA M, DYPBUKT JM, BONFOCO E, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S, LIPTON SA, NICOTERA P

Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function
Neuron 1995; 15:961-73

AOKI M, NOMURA F, STROMSKI ME, TSUJI MK, FACKLER JC, HICKEY PR, HOLTZMAN DH, JONAS RA

Effects of pH on brain energetics after hypothermic circulatory arrest
Ann Thorac Surg 1993; 55:1093-103

ARENDT CW, ALBRECHT B, SOOS TJ, LITTMAN DR

Protein kinase C- θ ; signaling from the center of the T-cell synapse
Curr Opin Immunol 2002; 14:323-30

ASIMAKOPOULOS G

Mechanisms of the systemic inflammatory response
Perfusion 1999; 14:269-77

AUER C, MAIR R

Klinische Erfahrungen bei der Perfusion von Fallot'schen Tetralogien mit Pulmonalatresie und aortopulmonalen Kollateralarterien
Kardiotechnik 2001; 4

BAEUEERLE PA, BAICHWAL VR

NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules
Adv Immunol 1997; 65:111-37

BAKER MA, STOCKING RA, MEEHAN JP

Thermal relationship between tympanic membrane and hypothalamus in conscious cat and monkey
J Appl Physiol 1972; 32:739-42

BALDWIN AS, JR.

The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights
Annu Rev Immunol 1996; 14:649-83

BAR-YOSEF S, MATHEW JP, NEWMAN MF, LANDOLFO KP, GROCOTT HP

Prevention of cerebral hyperthermia during cardiac surgery by limiting on-bypass rewarming in combination with post-bypass body surface warming: a feasibility study
Anesth Analg 2004; 99:641-6, table of contents

BAUD V, KARIN M

Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives
Trends Cell Biol 2001; 11:372-7

BAUMGARTNER WA, WALINSKY PL, SALAZAR JD, TSENG EE, BROCK MV, DOTY JR, REDMOND JM, BLUE ME, GOLDSBOROUGH MA, TRONCOSO JC, JOHNSTON MV

Assessing the impact of cerebral injury after cardiac surgery: will determining the mechanism reduce this injury?
Ann Thorac Surg 1999; 67:1871-3; discussion 91-4

BAZZONI F, BEUTLER B

The tumor necrosis factor ligand and receptor families
N Engl J Med 1996; 334:1717-25

BELLINGER DC, WYPIJ D, KUBAN KC, RAPPAPORT LA, HICKEY PR, WERNOVSKY G, JONAS RA, NEWBURGER JW

Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass
Circulation 1999; 100:526-32

BELLINGER LL

Ingestive behavior of rats with ibotenic acid lesions of the dorsomedial hypothalamus
Am J Physiol 1987; 252:R938-46

BENDTZEN K

Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity
Immunol Lett 1988; 19:183-91

BENDTZEN K

Immune hormones (cytokines); pathogenic role in autoimmune rheumatic and endocrine diseases

Autoimmunity 1989; 2:177-89

BENDTZEN K, FELDT-RASMUSSEN UF

[Chemokines and HIV infection]

Ugeskr Laeger 1997; 159:1956-7

BENVENISTE EN, KWON J, CHUNG WJ, SAMPSON J, PANDYA K, TANG LP

Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta

J Immunol 1994; 153:5210-21

BENVENISTE EN, SPARACIO SM, NORRIS JG, GRENETT HE, FULLER GM

Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes

J Neuroimmunol 1990; 30:201-12

BERNARDIS LL, BELLINGER LL

The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update

Brain Res 1987; 434:321-81

BEUTLER B, CERAMI A

Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin

Nature 1986; 320:584-8

BIEGER D, HOPKINS DA

Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus

J Comp Neurol 1987; 262:546-62

BISSONNETTE B, HOLTBY HM, DAVIS AJ, PUA H, GILDER FJ, BLACK M

Cerebral hyperthermia in children after cardiopulmonary bypass

Anesthesiology 2000; 93:611-8

BISSONNETTE B, PELLERIN L, RAVUSSIN P, DAVEN VB, MAGISTRETTI PJ

Deep hypothermia and rewarming alters glutamate levels and glycogen content in cultured astrocytes

Anesthesiology 1999; 91:1763-9

BJORK VO, HULTQUIST G

Contraindications to profound hypothermia in open-heart surgery

J Urol Nephrol (Paris) 1962; 44:1-13

BLATTEIS CM, SEHIC E

Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis

Ann N Y Acad Sci 1997; 813:445-7

BOKESCH PM, MARCHAND J, SEIRAFI PA, DEISS JM, WARNER KG, BRONSON RT, KREAM RM

Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest

Anesthesiology 1996; 85:1439-46

BOLIN LM, VERITY AN, SILVER JE, SHOOTER EM, ABRAMS JS

Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury

J Neurochem 1995; 64:850-8

BORGER MA, PENISTON CM, WEISEL RD, VASILIOU M, GREEN RE, FEINDEL CM
Neuropsychologic impairment after coronary bypass surgery: effect of gaseous microemboli during perfusionist interventions

J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121:743-9

BORGER MA, TAYLOR RL, WEISEL RD, KULKARNI G, BENAROIA M, RAO V, COHEN G, FEDORKO L, FEINDEL CM

Decreased cerebral emboli during distal aortic arch cannulation: a randomized clinical trial

J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 118:740-5

BOTTIGER BW, SCHMITZ B, WIESSNER C, VOGEL P, HOSSMANN KA

Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats

J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18:1077-87.

BREDER CD, DEWITT D, KRAIG RP

Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain

J Comp Neurol 1995; 355:296-315

BREDER CD, TSUJIMOTO M, TERANO Y, SCOTT DW, SAPER CB

Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system

J Comp Neurol 1993; 337:543-67

BRIX-CHRISTENSEN V

The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children

Acta Anaesthesiol Scand 2001; 45:671-9

BRIX-CHRISTENSEN V, TONNESEN E, SORENSEN IJ, BILFINGER TV, SANCHEZ RG, STEFANO GB

Effects of anaesthesia based on high versus low doses of opioids on the cytokine and acute-phase protein responses in patients undergoing cardiac surgery

Acta Anaesthesiol Scand 1998; 42:63-70

BROOKER RF, BROWN WR, MOODY DM, HAMMON JW, JR., REBOUSSIN DM, DEAL DD, GHAZI-BIRRY HS, STUMP DA

Cardiotomy suction: a major source of brain lipid emboli during cardiopulmonary bypass

Ann Thorac Surg 1998; 65:1651-5

BRUNBERG JA, REILLY EL, DOTY DB

Central nervous system consequences in infants of cardiac surgery using deep hypothermia and circulatory arrest

Circulation 1974; 50:II60-8

BUCHAN A, PULSINELLI W

Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia

J Neuroscience 1990; 10:311-6

BUCKBERG GD, BRAZIER JR, NELSON RL, GOLDSTEIN SM, MCCONNELL DH, COOPER N

Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating, and arrested heart

J Thorac Cardiovasc Surg 1977; 73:87-94

BUI NT, LIVOLSI A, PEYRON JF, PREHN JH

Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha

J Cell Biol 2001; 152:753-64

BUSTO R, DIETRICH W, GLOBUS M, VALDÉS I, SCHEINBERG P, GINSBERG M

Small differences in intranscemic brain temperature critically determine the extent of neuronal injury

J Cereb Blood Flow Metab 1987; 7:729-38

BUSTO R, DIETRICH W, GLOBUS M-T, GINSBERG M

The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury

Stroke 1989a; 20:1113-4

BUSTO R, GLOBUS MY-T, DIETRICH WD, MARTINEZ E, VALDES I, GINSBERG MD

Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain

Stroke 1989b; 20:904-10

BUTLER J, ROCKER G, WESTABY S

Inflammatory response to cardiopulmonary bypass

Ann Thorac Surg 1993; 55:552-9

CALDWELL C, CRAWFORD R, SINCLAIR I

Hypothermia after cardiopulmonary bypass in man

Anesthesiology 1981; 55:86-7

CAO C, MATSUMURA K, YAMAGATA K, WATANABE Y

Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever

Brain Res 1996; 733:263-72

- CARROLL JE, HOWARD EF, HESS DC, WAKADE CG, CHEN Q, CHENG C
Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment
Brain Res Mol Brain Res 1998; 56:186-91
- CASTANEDA AR
From Glenn to Fontan. A continuing evolution
Circulation 1992; 86:II80-4
- CHANDRASEKHARAN NV, DAI H, ROOS KL, EVANSON NK, TOMSIK J, ELTON TS, SIMMONS DL
COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:13926-31
- CHEN CS, LEU BK, LIU K
Detection of cerebral desaturation during cardiopulmonary bypass by cerebral oximetry [published erratum appears in Acta Anaesthesiol Sin 1997 Mar;35(1):59]
Acta Anaesthesiol Sin 1996; 34:173-8
- CHIANG CS, STALDER A, SAMIMI A, CAMPBELL IL
Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice
Dev Neurosci 1994; 16:212-21
- CHOI D, ROTHMAN S
The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death
Ann Rev Neurosci 1990; 13:171-82
- CHRISTMAN JW, LANCASTER LH, BLACKWELL TS
Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy
Intensive Care Med 1998; 24:1131-8
- CHUNG IY, BENVENISTE EN
Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta
J Immunol 1990; 144:2999-3007
- CLEMENS JA, STEPHENSON DT, SMALSTIG EB, DIXON EP, LITTLE SP
Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats
Stroke 1997; 28:1073-80; discussion 80-1
- COMBS DJ, D'ALECY LG
Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: Effect of fasting and 1,3-butanediol
Stroke 1987; 18:503-11
- COOK DJ
Cerebral hyperthermia and cardiac surgery: consequences and prevention
Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001; 13:176-83

COOLEY DA

Early development of congenital heart surgery: open heart procedures
Ann Thorac Surg 1997; 64:1544-8

COSELLI JS, LEMAIRE SA

Temperature management after hypothermic circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 123:621-3

COSGROVE D, LOOP F, LYTLE B, AL. E

Primary myocardial revascularization
J Thorac Cardiovasc Surg 1984; 88:673-84

CROFFORD LJ

COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions
J Rheumatol Suppl 1997; 49:15-9

CROUGHWELL N, LYTH M, QUILL TJ, NEWMAN M, GREELEY WJ, SMITH LR, REVES JG

Diabetic patients have abnormal cerebral autoregulation during cardiopulmonary bypass
Circulation 1990; 82:IV407-12

CROUGHWELL ND, FRASCO P, BLUMENTHAL JA, LEONE BJ, WHITE WD, REVES JG

Warming during cardiopulmonary bypass is associated with jugular bulb desaturation
Ann Thorac Surg 1992; 53:827-32

CROUGHWELL ND, NEWMAN MF, BLUMENTHAL JA, WHITE WD, LEWIS JB, FRASCO PE, SMITH LR, THYRUM EA, HURWITZ BJ, LEONE BJ, ET AL.

Jugular bulb saturation and cognitive dysfunction after cardiopulmonary bypass
Ann Thorac Surg 1994; 58:1702-8

DAVIS RJ

The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway
J Biol Chem 1993; 268:14553-6

DEL REY A, BESEDOVSKY HO

Metabolic and neuroendocrine effects of pro-inflammatory cytokines
Eur J Clin Invest 1992; 22 Suppl 1:10-5

DELEON S, ILBAWI M, ARCILLA R, CUTILLET A, EGEL R, WONG A, QUINONES J, HUSAYNI T, OBEID M, SULAYMAN R, ET AL.

Choreoathetosis after deep hypothermia without circulatory arrest
Ann Thorac Surg 1990; 50:714-9

DENIZOT Y, LORGEOT V, CORNU E, NATHAN N

Plasma leukaemia inhibitory factor, interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor levels during cardiopulmonary bypass with extracorporeal circulation
Cytokine 1998; 10:303-6

DEXTER F, HINDMAN B

Theoretical Analysis of Cerebral Venous Blood Hemoglobin Oxygen Saturation as an Index of Cerebral Oxygenation during Hypothermic Cardiopulmonary Bypass.

Anesthesiology 1995; 83:405-12

DI SANTO E, ALONZI T, FATTORI E, POLI V, CILIBERTO G, SIRONI M, GNOCCHI P, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, GHEZZI P

Overexpression of interleukin-6 in the central nervous system of transgenic mice increases central but not systemic proinflammatory cytokine production

Brain Res 1996; 740:239-44

DIELEMAN JM, DE LANGE F, HOUSTON RJ, BIESSELS GJ, BAR PR, MACKENSEN GB, GROCOTT HP, KALKMAN CJ

Cardiopulmonary bypass and long-term neurocognitive dysfunction in the rat

Life Sci 2006; 79:551-8

DIETRICH W, ALONSO O, BUSTO R

Moderate hyperglycemia worsens acute blood brain barrier injury after forebrain ischemia in rats

Stroke 1993; 24:111-5

DIETRICH W, BUSTO R, VALDES I, LOOR Y

Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats

Stroke 1990; 21:1318-25

DITTRICH H, BUHRER C, GRIMMER I, DITTRICH S, ABDUL-KHALIQ H, LANGE PE

Neurodevelopment at 1 year of age in infants with congenital heart disease

Heart 2003; 89:436-41

DU PLESSIS AJ

Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery. Mechanisms of injury and strategies for protection

J Child Neurol 1997; 12:285-300

DU PLESSIS AJ, CHANG AC, WESSEL DL, LOCK JE, WERNOVSKY G, NEWBURGER JW, MAYER JE, JR.

Cerebrovascular accidents following the Fontan operation

Pediatr Neurol 1995; 12:230-6

DUEBENER LF, SAKAMOTO T, HATSUOKA S, STAMM C, ZURAKOWSKI D, VOLLMAR B, MENDER MD, SCHAFERS HJ, JONAS RA

Effects of hematocrit on cerebral microcirculation and tissue oxygenation during deep hypothermic bypass

Circulation 2001; 104:I260-4

EHYAI A, FENICHEL GM, BENDER HW, JR.

Incidence and prognosis of seizures in infants after cardiac surgery with profound hypothermia and circulatory arrest

Jama 1984; 252:3165-7

ELMQUIST JK, BREDER CD, SHERIN JE, SCAMMELL TE, HICKEY WF, DEWITT D, SAPER CB

Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages
J Comp Neurol 1997; 381:119-29

ENOMOTO S, HINDMAN BJ, DEXTER F, SMITH T, CUTKOMP J

Rapid rewarming causes an increase in the cerebral metabolic rate for oxygen that is temporarily unmatched by cerebral blood flow. A study during cardiopulmonary bypass in rabbits
Anesthesiology 1996; 84:1392-400

EO D

A central role for ciliary neurotropic factor?
Proc natl Acad Sc USA 1993; 90

ERTEL W, MORRISON MH, AYALA A, PERRIN MM, CHAUDRY IH

Blockade of prostaglandin production increases cachectin synthesis and prevents depression of macrophage functions after hemorrhagic shock
Ann Surg 1991; 213:265-71

FEENEY DM, GONZALEZ A, LAW WA

Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury
Science 1982; 217:855-7

FERRY PC

Neurologic sequelae of cardiac surgery in children
Am J Dis Child 1987; 141:309-12

FERRY PC

Neurologic sequelae of open-heart surgery in children. An 'irritating question'
Am J Dis Child 1990; 144:369-73

FITZPATRICK FA, SOBERMAN R

Regulated formation of eicosanoids
J Clin Invest 2001; 107:1347-51

FREI K, MALIPIERO UV, LEIST TP, ZINKERNAGEL RM, SCHWAB ME, FONTANA A
On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases

Eur J Immunol 1989; 19:689-94

FURUKAWA K, BARGER SW, BLALOCK EM, MATTSON MP

Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein
Nature 1996; 379:74-8

GABRIEL C, JUSTICIA C, CAMINS A, PLANAS AM

Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia
Brain Res Mol Brain Res 1999; 65:61-9

GADIENT RA, OTTEN U

Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats

Neurosci Lett 1994; 182:243-6

GADIENT RA, OTTEN UH

Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials

Prog Neurobiol 1997; 52:379-90

GIBBON J

Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery

Minn Med 1954; 37:171-80

GILL R, MURKIN JM

Neuropsychologic dysfunction after cardiac surgery: what is the problem?

J Cardiothorac Vasc Anesth 1996; 10:91-8

GILLUM RF

Epidemiology of congenital heart disease in the United States

Am Heart J 1994; 127:919-27

GILMAN S

Neurological complications of open heart surgery [editorial; comment]

Ann Neurol 1990; 28:475-6

GINSBERG M, BUSTO R

Rodent models of cerebral ischemia

Stroke 1989; 20:1627-42

GINSBERG MD, BUSTO R

Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern

Stroke 1998; 29:529-34

GOLD JP, CHARLSON ME, WILLIAMS-RUSSO P, SZATROWSKI TP, PETERSON JC, PIRRAGLIA PA, HARTMAN GS, YAO FS, HOLLENBERG JP, BARBUT D, ET AL.

Improvement of outcomes after coronary artery bypass. A randomized trial comparing intraoperative high versus low mean arterial pressure

J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:1302-11; discussion 11-4

GOTTSCHALL PE, TATSUNO I, ARIMURA A

Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)

Brain Res 1994; 637:197-203

GOVIER AV, REVES JG, MCKAY RD, KARP RB, ZORN GL, MORAWETZ RB, SMITH LR, ADAMS M, FREEMAN AM

Factors and their influence on regional cerebral blood flow during nonpulsatile cardiopulmonary bypass

Ann Thorac Surg 1984; 38:592-600

GREELEY WJ, KERN FH, UNGERLEIDER RM, BOYD JL, 3RD, QUILL T, SMITH LR, BALDWIN B, REVES JG

The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children

J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 101:783-94

GREELEY WJ, UNGERLEIDER RM, KERN FH, BRUSINO FG, SMITH LR, REVES JG

Effects of cardiopulmonary bypass on cerebral blood flow in neonates, infants, and children
Circulation 1989; 80:1209-15

GRESSENS P

VIP neuroprotection against excitotoxic lesions of the developing mouse brain

Ann N Y Acad Sci 1999; 897:109-24

GRIGORE AM, GROCOTT HP, MATHEW JP, PHILLIPS-BUTE B, STANLEY TO, BUTLER A, LANDOLFO KP, REVES JG, BLUMENTHAL JA, NEWMAN MF

The rewarming rate and increased peak temperature alter neurocognitive outcome after cardiac surgery

Anesth Analg 2002; 94:4-10, table of contents.

GRIMALDI M, POZZOLI G, NAVARRA P, PREZIOSI P, SCHETTINI G

Vasoactive intestinal peptide and forskolin stimulate interleukin 6 production by rat cortical astrocytes in culture via a cyclic AMP-dependent, prostaglandin-independent mechanism

J Neurochem 1994; 63:344-50

GROCOTT HP, NUSSMEIER NA

Neuroprotection in cardiac surgery

Anesthesiol Clin North America 2003; 21:487-509, viii

GUERRINI L, BLASI F, DENIS-DONINI S

Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro

Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:9077-81

GV-SOLAS - GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE - SOCIETY FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE

Planung und Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen, In: GV-Solas (Hrsg.)

4. Auflage, Verlag GV-SOLAS, Biberach a. d. Riss, 1988

HAMMOND C, CREPEL V, GOZLAN H, BEN-ARI Y

Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors

Trends Neurosci 1994; 17:497-503

HAN JW, SADOWSKI H, YOUNG DA, MACARA IG

Persistent induction of cyclooxygenase in p60v-src-transformed 3T3 fibroblasts

Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87:3373-7

HANRAHAN JD, COX IJ, EDWARDS AD, COWAN FM, SARGENTONI J, BELL JD, BRYANT DJ, RUTHERFORD MA, AZZOPARDI D

Persistent increases in cerebral lactate concentration after birth asphyxia

Pediatr Res 1998; 44:304-11

HARIRI RJ, CHANG VA, BARIE PS, WANG RS, SHARIF SF, GHAJAR JB
Traumatic injury induces interleukin-6 production by human astrocytes
Brain Res 1994; 636:139-42

HARTMAN GS, PETERSON J, KONSTADT SN, HAHN R, SZATROWSKI TP,
CHARLSON ME, BRUEFACH M, 3RD
High reproducibility in the interpretation of intraoperative transesophageal echocardiographic
evaluation of aortic atheromatous disease
Anesth Analg 1996; 82:539-43

HAYWARD JN, BAKER MA
Role of cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in the monkey
Am J Physiol 1968; 215:389-403

HEINEMANN M
Zerebrale Protektion in der Kinderherzchirurgie - eine Bestandsaufnahme
Z Herz-Thorax-Gefäßchir 2002; 16:1-4

HINDMAN BJ, MOORE SA, CUTKOMP J, SMITH T, ROSS-BARTA SE, DEXTER F,
BRIAN JE, JR.
Brain expression of inducible cyclooxygenase 2 messenger RNA in rats undergoing
cardiopulmonary bypass
Anesthesiology 2001; 95:1380-8

HIRAMATSU T, MIURA T, FORBESS JM, DU PLESSIS A, AOKI M, NOMURA F,
HOLTZMAN D, JONAS RA
pH strategies and cerebral energetics before and after circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109:948-57; discussion 57-8

HOLTZCLAW BJ
The febrile response in critical care: state of the science
Heart Lung 1992; 21:482-501

HOON AH, JR., REINHARDT EM, KELLEY RI, BREITER SN, MORTON DH, NAIDU
SB, JOHNSTON MV
Brain magnetic resonance imaging in suspected extrapyramidal cerebral palsy: observations
in distinguishing genetic-metabolic from acquired causes
J Pediatr 1997; 131:240-5

HORI A, HIROSE G, KATAOKA S, TSUKADA K, FURUI K, TONAMI H
Delayed postanoxic encephalopathy after strangulation. Serial neuroradiological and
neurochemical studies
Arch Neurol 1991; 48:871-4

HOVELS-GURICH HH, SEGHAIE MC, DABRITZ S, MESSMER BJ, VON BERNUTH G
Cognitive and motor development in preschool and school-aged children after neonatal
arterial switch operation
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 114:578-85

HSU H, SHU HB, PAN MG, GOEDDEL DV

TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways

Cell 1996; 84:299-308

HSU H, XIONG J, GOEDDEL DV

The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation

Cell 1995; 81:495-504

HUANG CY, FUJIMURA M, NOSHITA N, CHANG YY, CHAN PH

SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia

J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21:163-73

HUNTER T

Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling

Cell 1995; 80:225-36

IMURA H, FUKATA J, MORI T

Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems

Clin Endocrinol (Oxf) 1991; 35:107-15

INVESTIGATORS TWH

Randomised trial of normothermic versus hypothermic coronary bypass surgery

Lancet 1994; 343:559-63

JAGGERS JJ, NEAL MC, SMITH PK, UNGERLEIDER RM, LAWSON JH

Infant cardiopulmonary bypass: a procoagulant state

Ann Thorac Surg 1999; 68:513-20

JIANG Y, CHEN C, LI Z, GUO W, GEGNER JA, LIN S, HAN J

Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)

J Biol Chem 1996; 271:17920-6

JIANG Y, GRAM H, ZHAO M, NEW L, GU J, FENG L, DI PADOVA F, ULEVITCH RJ, HAN J

Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta

J Biol Chem 1997; 272:30122-8

JOHNSON DG, HAYWARD JS, JACOBS TP, COLLIS ML, ECKERSON JD, WILLIAMS RH

Plasma norepinephrine responses of man in cold water

J Appl Physiol 1977; 43:216-20

JOHNSTON MV, HOON AH, JR.

Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies

J Child Neurol 2000; 15:588-91

JOHNSTON MV, TRESCHER WH, ISHIDA A, NAKAJIMA W
Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain
Pediatr Res 2001; 49:735-41.

JOHNSTON MV, TRESCHER WH, TAYLOR GA
Hypoxic and ischemic central nervous system disorders in infants and children
Adv Pediatr 1995; 42:1-45

JONAS RA
Neurological protection during cardiopulmonary bypass/deep hypothermia
Pediatr Cardiol 1998; 19:321-30

JONAS RA, BELLINGER DC, RAPPAPORT LA, WERNOVSKY G, HICKEY PR,
FARRELL DM, NEWBURGER JW
Relation of pH strategy and developmental outcome after hypothermic circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 106:362-8

JONAS RA, WYPIJ D, ROTH SJ, BELLINGER DC, VISCONTI KJ, DU PLESSIS AJ,
GOODKIN H, LAUSSEN PC, FARRELL DM, BARTLETT J, MCGRATH E,
RAPPAPORT LJ, BACHA EA, FORBESS JM, DEL NIDO PJ, MAYER JE, JR.,
NEWBURGER JW
The influence of hemodilution on outcome after hypothermic cardiopulmonary bypass: results
of a randomized trial in infants
J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 126:1765-74

JONES SB, DEPOCAS F, CHAN CC
Plasma catecholamines in rats during rewarming from induced hypothermia
J Appl Physiol 1984; 57:808-14

JONES TJ, DEAL DD, VERNON JC, BLACKBURN N, STUMP DA
How effective are cardiopulmonary bypass circuits at removing gaseous microemboli?
J Extra Corpor Technol 2002; 34:34-9

JOURNOIS D, ISRAEL-BIET D, POUARD P, ROLLAND B, SILVESTER W, VOUHE P,
SAFRAN D
High-volume, zero-balanced hemofiltration to reduce delayed inflammatory response to
cardiopulmonary bypass in children
Anesthesiology 1996; 85:965-76

JUNGWIRTH B, MACKENSEN GB, BLOBNER M, NEFF F, REICHART B, KOCHS EF,
NOLLERT G
Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest
in rats: description of a new model
J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131:805-12

KAKU DA, GIFFARD RG, CHOI DW
Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity
Science 1993; 260:1516-8

- KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT B, BAEUERLE PA
Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons
Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:9618-22
- KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT B, LANNES-VIEIRA J, KREUTZBERG GW, WEKERLE H, BAEUERLE PA, GEHRMANN J
Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis
J Neuroimmunol 1994; 55:99-106
- KAMINSKA B
MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits
Biochim Biophys Acta 2005; 1754:253-62
- KAULITZ R, BERGMANN R, HEYER R, HC K
Akutes Chorea-Syndrom nach Herzoperation am hypothermen kardiopulmonalen Bypass (Post pump chorea, PPC)
Monatsschr Kinderheilkd 1997; 145:887-91
- KELLERMANN K, JUNGWIRTH B, GORDAN M, KOCHS E, BLOBNER M, NOLLERT G
Long-term evaluation of cerebral inflammatory reaction and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats
European Journal of Anaesthesiology 2006; 23 Supplement 37: A-382, p101
- KELLIHER MA, GRIMM S, ISHIDA Y, KUO F, STANGER BZ, LEDER P
The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal
Immunity 1998; 8:297-303
- KENNEDY C, SOKOLOFF L
An adaptation of the nitrous oxide method to the study of the cerebral circulation in children; normal values for cerebral blood flow and cerebral metabolic rate in childhood
J Clin Invest 1957; 36:1130-7
- KIRKLIN JK, BLACKSTONE EH, KIRKLIN JW
Cardiopulmonary bypass: studies on its damaging effects
Blood Purif 1987; 5:168-78
- KIRKLIN JK, WESTABY S, BLACKSTONE EH, KIRKLIN JW, CHENOWETH DE, PACIFICO AD
Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass
J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86:845-57
- KNUDSEN F, ANDERSEN L
Immunological Aspects of Cardiopulmonary Bypass
Journal of Cardiothoracic Anesthesia 1990; 4:245-58

KOLB B, WHISHAW IQ

An observer's view of locomotor asymmetry in the rat
Neurobehav Toxicol Teratol 1985; 7:71-8

KUMAR S, MCDONNELL PC, GUM RJ, HAND AT, LEE JC, YOUNG PR

Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles
Biochem Biophys Res Commun 1997; 235:533-8

KUPSKY WJ, DROZD MA, BARLOW CF

Selective injury of the globus pallidus in children with post-cardiac surgery choreic syndrome
Dev Med Child Neurol 1995; 37:135-44

KURTH CD, PRIESTLEY M, GOLDEN J, MCCANN J, RAGHUPATHI R

Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs
J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 118:1068-77

LAEMMLI UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 1970; 227:680-5

LAPTOOK A, CORBELL R, ARENCIBIA-MIRELES O, RULEY J, GARCIA D

The effects of systemic glucose concentration on brain metabolism following repeated brain ischemia
Brain Res 1994; 638:78-84

LARSEN R

Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-,Thorax-und Gefäßchirurgie. 4. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer

LAUSSEN PC

Neonates with congenital heart disease
Curr Opin Pediatr 2001; 13:220-6

LE BAIL O, SCHMIDT-ULLRICH R, ISRAEL A

Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family
Embo J 1993; 12:5043-9

LE DEIST F, MENASCHE P, KUCHARSKI C, BEL A, PIWNICA A, BLOCH G

Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study
Circulation 1995; 92:II354-8

LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC, GALLAGHER TF, KUMAR S, GREEN D, MCNULTY D, BLUMENTHAL MJ, HEYS JR, LANDVATTER SW, ET AL.

A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis
Nature 1994; 372:739-46

- LEE JC, YOUNG PR
Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms
J Leukoc Biol 1996; 59:152-7
- LESLIE RA, GWYN DG, HOPKINS DA
The central distribution of the cervical vagus nerve and gastric afferent and efferent projections in the rat
Brain Res Bull 1982; 8:37-43
- LI Q, VERMA IM
NF-kappaB regulation in the immune system
Nat Rev Immunol 2002; 2:725-34
- LI S-G, RANDALL D, BROWN D
Roles of cardiac output and peripheral resistance in mediating blood pressure response to stress in rats.
Am J Physiol 1998a; 274:1065-69
- LI Y, POWERS C, JIANG N, CHOPP M
Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat
J Neurol Sci 1998b; 156:119-32.
- LI Z, JIANG Y, ULEVITCH RJ, HAN J
The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases
Biochem Biophys Res Commun 1996; 228:334-40
- LIMPEROPOULOS C, MAJNEMER A, SHEVELL MI, ROHLICEK C, ROSENBLATT B, TCHERVENKOV C, DARWISH HZ
Predictors of developmental disabilities after open heart surgery in young children with congenital heart defects
J Pediatr 2002; 141:51-8
- LIU ZG, HSU H, GOEDDEL DV, KARIN M
Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death
Cell 1996; 87:565-76
- MACKENSEN GB, SATO Y, NELLGARD B, PINEDA J, NEWMAN MF, WARNER DS, GROCOTT HP
Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat
Anesthesiology 2001; 95:1485-91.
- MAHLE WT, LUNDINE K, KANTER K, FERBESS JM, KIRSHBOM P, SR T, RN V
The short term effects of cardiopulmonary bypass on neurologic function in children and young adults
E J Cardiothorac Surg 2004:920-5

MAHLE WT, LUNDINE K, KANTER KR, FORBESS JM, KIRSHBOM P, TOSONE SR, VINCENT RN

The short term effects of cardiopulmonary bypass on neurologic function in children and young adults

Eur J Cardiothorac Surg 2004; 26:920-5

MAHLE WT, WERNOVSKY G

Neurodevelopmental outcomes in hypoplastic left heart syndrome

Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu 2004; 7:39-47

MAIMONE D, CIONI C, ROSA S, MACCHIA G, ALOISI F, ANNUNZIATA P

Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha

J Neuroimmunol 1993; 47:73-81

MAJNEMER A, LIMPEROPOULOS C

Developmental progress of children with congenital heart defects requiring open heart surgery

Semin Pediatr Neurol 1999; 6:12-9

MANTOVANI A, SOZZANI S, VECCHI A, INTRONA M, ALLAVENA P

Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm

Thromb Haemost 1997; 78:406-14

MARION D, OBRIST W, CARLIER P, PENROD L, DARBY J

The use of moderate therapeutic hypothermia for patients with severe head injuries: a preliminary report

J Neurosurg 1993; 79:354-62

MATTSON MP, CULMSEE C, YU Z, CAMANDOLA S

Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity

J Neurochem 2000; 74:443-56

MAULT JR, OHTAKE S, KLINGENSMITH ME, HEINLE JS, GREELEY WJ, UNGERLEIDER RM

Cerebral metabolism and circulatory arrest: effects of duration and strategies for protection

Ann Thorac Surg 1993; 55:57-63; discussion -4

MCDONALD JW, JOHNSTON MV

Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development

Brain Res Brain Res Rev 1990; 15:41-70

MCDONALD JW, SILVERSTEIN FS, JOHNSTON MV

Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system

Brain Res 1988; 459:200-3

MCHALE K, CERMAK SA

Fine motor activities in elementary school: preliminary findings and provisional implications for children with fine motor problems

Am J Occup Ther 1992; 46:898-903

MENKES JH, CURRAN J

Clinical and MR correlates in children with extrapyramidal cerebral palsy

AJNR Am J Neuroradiol 1994; 15:451-7

MEZROW CK, SADEGHI AM, GANDSAS A, DAPUNT OE, SHIANG HH, ZAPPULLA RA, GRIEPP RB

Cerebral effects of low-flow cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest

Ann Thorac Surg 1994; 57:532-9; discussion 9

MICHENFELDER JD, THEYE RA

Cerebral protection by thiopental during hypoxia

Anesthesiology 1973; 39:510-7

MILLER G, EGGLI KD, CONTANT C, BAYLEN BG, MYERS JL

Postoperative neurologic complications after open heart surgery on young infants [see comments]

Arch Pediatr Adolesc Med 1995; 149:764-8

MINDRESCU C, LE J, WISNIEWSKI HG, VILCEK J

Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression by TSG-6 protein in macrophage cell line

Biochem Biophys Res Commun 2005; 330:737-45

MINGHETTI L

Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases

J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63:901-10

MIZUNO T, SAWADA M, SUZUMURA A, MARUNOUCHI T

Expression of cytokines during glial differentiation

Brain Res 1994; 656:141-46

MOLINA JE, EINZIG S, MASTRI AR, BIANCO RW, MARKS JA, RASMUSSEN TM, CLACK RM

Brain damage in profound hypothermia. Perfusion versus circulatory arrest

J Thorac Cardiovasc Surg 1984; 87:596-604

MONYER H, BURNASHEV N, LAURIE DJ, SAKMANN B, SEEBURG PH

Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors

Neuron 1994; 12:529-40

MOODY DM, BROWN WR, CHALLA VR, STUMP DA, REBOUSSIN DM, LEGAULT C

Brain microemboli associated with cardiopulmonary bypass: a histologic and magnetic resonance imaging study

Ann Thorac Surg 1995; 59:1304-7

MOYNAGH PN, WILLIAMS DC, O'NEILL LA

Interleukin-1 activates transcription factor NF kappa B in glial cells

Biochem J 1993; 294 (Pt 2):343-7

MUJSCE D, TOWFIGHI J, HEITJAN D, VANNUCCI R

Differences in intraischemic temperature influence neurological outcome after deep hypothermic circulatory arrest in newborn dogs
Stroke 1994; 25:1433-41

MURDOCH J, HALL R

Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part I: the physiology of brain injury
Can J Anaesth 1990; 37:663-71

MURKIN JM, FARRAR JK, TWEED WA, MCKENZIE FN, GUIRAUDON G

Cerebral autoregulation and flow/metabolism coupling during cardiopulmonary bypass: the influence of PaCO₂
Anesth Analg 1987; 66:825-32

MUTCH WA, RYNER LN, KOZLOWSKI P, SCARTH G, WARRIAN RK, LEFEVRE GR, WONG TG, THIESSEN DB, GIRLING LG, DOIRON L, MCCUDDEN C, SAUNDERS JK
Cerebral hypoxia during cardiopulmonary bypass: a magnetic resonance imaging study
Ann Thorac Surg 1997; 64:695-701

NAGATA S

Fas ligand-induced apoptosis
Annu Rev Genet 1999; 33:29-55

NEWBURGER JW, JONAS RA, WERNOVSKY G, WYPIJ D, HICKEY PR, KUBAN KC, FARRELL DM, HOLMES GL, HELMERS SL, CONSTANTINOU J, ET AL.

A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery [see comments]
N Engl J Med 1993; 329:1057-64

NEWMAN MF, CROUGHWELL ND, BLUMENTHAL JA, WHITE WD, LEWIS JB, SMITH LR, FRASCO P, TOWNER EA, SCHELL RM, HURWITZ BJ, ET AL.

Effect of aging on cerebral autoregulation during cardiopulmonary bypass. Association with postoperative cognitive dysfunction
Circulation 1994; 90:II243-9

NEWMAN MF, GROCOTT HP, MATHEW JP, WHITE WD, LANDOLFO K, REVES JG, LASKOWITZ DT, MARK DB, BLUMENTHAL JA

Report of the substudy assessing the impact of neurocognitive function on quality of life 5 years after cardiac surgery
Stroke 2001; 32:2874-81

NEWMAN MF, KRAMER D, CROUGHWELL ND, SANDERSON I, BLUMENTHAL JA, WHITE WD, SMITH LR, TOWNER EA, REVES JG

Differential age effects of mean arterial pressure and rewarming on cognitive dysfunction after cardiac surgery
Anesth Analg 1995; 81:236-42

NISHIDA E, GOTOH Y

The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways
Trends Biochem Sci 1993; 18:128-31

NORWOOD WI, NORWOOD CR, CASTANEDA AR

Cerebral anoxia: effect of deep hypothermia and pH

Surgery 1979; 86:203-9

NOVELLI A, REILLY JA, LYSKO PG, HENNEBERRY RC

Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced

Brain Res 1988; 451:205-12

NOZAKI K, NISHIMURA M, HASHIMOTO N

Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia

Mol Neurobiol 2001; 23:1-19

NUSSMEIER NA

Management of temperature during and after cardiac surgery

Tex Heart Inst J 2005; 32:472-6

OATES RK, SIMPSON JM, TURNBULL JA, CARTMILL TB

The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia [see comments]

J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:786-92

OKUSAWA S, GELFAND JA, IKEJIMA T, CONNOLLY RJ, DINARELLO CA

Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition

J Clin Invest 1988; 81:1162-72

OLNEY JW, COLLINS RC, SLOVITER RS

Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage

Adv Neurol 1986; 44:857-77

OLSEN T, LARSEN B, HERNING M, SKRIVER E, LASSEN N

Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue: Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke

Stroke 1983; 14:332-41

O'NEILL GP, FORD-HUTCHINSON AW

Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues

FEBS Lett 1993; 330:156-60

O'NEILL LA, KALTSCHMIDT C

NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function

Trends Neurosci 1997; 20:252-8

OPP M, OBAL F, JR., CADY AB, JOHANNSEN L, KRUEGER JM

Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic

Physiol Behav 1989; 45:1069-72

PAPARELLA D, YAU TM, YOUNG E

Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update

Eur J Cardiothorac Surg 2002; 21:232-44

PARK SC, NECHES WH

The neurologic complications of congenital heart disease

Neurol Clin 1993; 11:441-62

PARK YC, YE H, HSIA C, SEGAL D, RICH RL, LIOU HC, MYSZKA DG, WU H

A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction

Cell 2000; 101:777-87

PATTERSON PH

The emerging neuropoietic cytokine family: first CDF/LIF, CNTF and IL-6; next ONC, MGF, GCSF?

Curr Opin Neurobiol 1992; 2:94-7

PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH

Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions

Endocr Rev 2001; 22:153-83

PERRY VH, BELL MD, BROWN HC, MATYSZAK MK

Inflammation in the nervous system

Curr Opin Neurobiol 1995; 5:636-41

PICCA S, PRINCIPATO F, MAZZERA E, CORONA R, FERRIGNO L, MARCELLETTI C, RIZZONI G

Risks of acute renal failure after cardiopulmonary bypass surgery in children: a retrospective 10-year case-control study

Nephrol Dial Transplant 1995; 10:630-6

PICKARD GE, TUREK FW

The suprachiasmatic nuclei: two circadian clocks?

Brain Res 1983; 268:201-10

PRIESTLEY MA, GOLDEN JA, O'HARA IB, MCCANN J, KURTH CD

Comparison of neurologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest with alpha-stat and pH-stat cardiopulmonary bypass in newborn pigs

J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121:336-43

PROCTOR E

An oxygenator for cardiopulmonary bypass in the rat

J Surg Res 1977; 22:124-7

PRONDZINSKY R, MULLER-WERDAN U, PILZ G, WITTHAUT R, STABENOW I, WERDAN K, ZERKOWSKI HR

[Systemic inflammatory reactions to extracorporeal therapy measures (II): Cardiopulmonary bypass]

Wien Klin Wochenschr 1997; 109:346-53

PUA HL, BISSONNETTE B

Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass

Can J Anaesth 1998; 45:960-78

- PULSINELLI WA, WALDMAN S, RAWLINSON D, PLUM F
Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat
Neurology 1982; 32:1239-46
- RAHN H, REEVES RB, HOWELL BJ
Hydrogen ion regulation, temperature, and evolution
Am Rev Respir Dis 1975; 112:165-72
- RAJEK A, LENHARDT R, SESSLER DI, BRUNNER G, HAIJSACKL M, KASTNER J, LAUFER G
Efficacy of two methods for reducing postbypass afterdrop
Anesthesiology 2000; 92:447-56
- RALL JM, MACH SA, DASH PK
Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats
Brain Res 2003; 968:273-6
- RAMSAY RG, CIZNADIJA D, VANEVSKI M, MANTAMADIOTIS T
Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control
Int J Immunopathol Pharmacol 2003; 16:59-67
- REDMOND JM, GILLINOV AM, ZEHR KJ, BLUE ME, TRONCOSO JC, REITZ BA, CAMERON DE, JOHNSTON MV, BAUMGARTNER WA
Glutamate excitotoxicity: a mechanism of neurologic injury associated with hypothermic circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107:776-86; discussion 86-7
- RICCERI L, MINGHETTI L, MOLES A, POPOLI P, CONFALONI A, DE SIMONE R, PISCOPO P, SCATTONI ML, DI LUCA M, CALAMANDREI G
Cognitive and neurological deficits induced by early and prolonged basal forebrain cholinergic hypofunction in rats
Exp Neurol 2004; 189:162-72
- RINGHEIM GE, BURGHER KL, HEROUX JA
Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain
J Neuroimmunol 1995; 63:113-23
- ROACH G, KANCHUGER M, MORA MANGANO C, NEWMAN M
Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery
N Engl J Med 1996; 335:1857-63
- ROBINSON RO, SAMUELS M, POHL KR
Choreic syndrome after cardiac surgery
Arch Dis Child 1988; 63:1466-9
- ROCHE LEXIKON MEDIZIN
In: Roche Lexikon Medizin: S. 1051
5. Edition, Urban & Fischer, München, 2003

- ROKKAS CK, CRONIN CS, NITTA T, HELFRICH LR, JR., LOBNER DC, CHOI DW, KOUCHOUKOS NT
 Profound systemic hypothermia inhibits the release of neurotransmitter amino acids in spinal cord ischemia
 J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:27-35
- SALMINEN A, LIU PK, HSU CY
 Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain
 Biochem Biophys Res Commun 1995; 212:939-44
- SAPER CB
 Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections
 J Comp Neurol 1985; 237:21-46
- SARNAT HB, SARNAT MS
 Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study
 Arch Neurol 1976; 33:696-705
- SASON-TON Y, BEN ABRAHAM R, LOTAN D, DAGAN O, PRINCE T, BARZILAY Z, PARET G
 Tumor necrosis factor and clinical and metabolic courses after cardiac surgery in children
 J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 124:991-8
- SCHNEIDER A, MARTIN-VILLALBA A, WEIH F, VOGEL J, WIRTH T, SCHWANINGER M
 NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia
 Nat Med 1999; 5:554-9
- SCHOBITZ B, VOORHUIS DA, DE KLOET ER
 Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain
 Neurosci Lett 1992; 136:189-92
- SEGER R, KREBS EG
 The MAPK signaling cascade
 FASEB J 1995; 9:726-35
- SEGHAYE MC, DUCHATEAU J, GRABITZ RG, FAYMONVILLE ML, MESSMER BJ, BURO-RATHSMANN K, VON BERNUTH G
 Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure
 J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 106:978-87
- SELNES OA, MCKHANN GM, BOROWICZ LM, JR., GREGA MA
 Cognitive and neurobehavioral dysfunction after cardiac bypass procedures
 Neurol Clin 2006; 24:133-45
- SHAABAN ALI M, HARMER M, KIRKHAM F
 Cardiopulmonary bypass temperature and brain function
 Anaesthesia 2005; 60:365-72

- SHAFTTEL SS, OLSCHOWKA JA, HURLEY SD, MOORE AH, O'BANION MK
COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells
Brain Res Mol Brain Res 2003; 119:213-5
- SHAW PJ, BATES D, CARTLIDGE NE, FRENCH JM, HEAVISIDE D, JULIAN DG, SHAW DA
Neurologic and neuropsychological morbidity following major surgery: comparison of coronary artery bypass and peripheral vascular surgery
Stroke 1987; 18:700-7
- SHIN'OKA T, SHUM-TIM D, LAUSSEN PC, ZINKOVSKY SM, LIDOV HG, DU PLESSIS A, JONAS RA
Effects of oncotic pressure and hematocrit on outcome after hypothermic circulatory arrest
Ann Thorac Surg 1998; 65:155-64
- SHIRAKI K, SAGAWA S, TAJIMA F, YOKOTA A, HASHIMOTO M, BRENGELMANN GL
Independence of brain and tympanic temperatures in an unanesthetized human
J Appl Physiol 1988; 65:482-6
- SHOHAM S, DAVENNE D, CADY AB, DINARELLO CA, KRUEGER JM
Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep
Am J Physiol 1987; 253:R142-9
- SHUM-TIM D, NAGASHIMA M, SHINOKA T, BUCERIUS J, NOLLERT G, LIDOV HG, DU PLESSIS A, LAUSSEN PC, JONAS RA
Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 116:780-92
- SILLESEN H, NEDERGAARD M, SCHROEDER T, BUCHARDT HANSEN HJ
Middle cerebral artery occlusion in presence of low perfusion pressure increases infarct size in rats
Neurol Res 1988; 10:61-3
- SILVERMAN N, MANIATIS T
NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity
Genes Dev 2001; 15:2321-42
- SKARYAK LA, KIRSHBOM PM, DIBERNARDO LR, KERN FH, GREELEY WJ, UNGERLEIDER RM, GAYNOR JW
Modified ultrafiltration improves cerebral metabolic recovery after circulatory arrest
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109:744-51; discussion 51-2
- SMINIA P, VAN DER ZEE J, WONDERGEM J, HAVEMAN J
Effect of hyperthermia on the central nervous system: a review
Int J Hyperthermia 1994; 10:1-30

SMITH P, TREASURE T, NEWMAN S, JOSEPH P, ELL P, SCHNEIDAU A, HARRISON M

Cerebral consequences of cardiopulmonary bypass
Lancet 1986; 1:823-5

SMITH WL, DEWITT DL, GARAVITO RM

Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology
Annu Rev Biochem 2000; 69:145-82

SMITH WL, GARAVITO RM, DEWITT DL

Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2
J Biol Chem 1996; 271:33157-60

SOKOLOFF L

The F.O. Schmitt Lecture in Neuroscience 1980. The relationship between function and energy metabolism: its use in the localization of functional activity in the nervous system
Neurosci Res Program Bull 1981; 19:159-207

SOSLAU G, MORGAN DA, JAFFE JS, BRODSKY I, WANG Y

Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function
Cytokine 1997; 9:405-11

STEFFEN JM

Glucose, glycogen, and insulin responses in the hypothermic rat
Cryobiology 1988; 25:94-101

STEPHENSON D, YIN T, SMALSTIG EB, HSU MA, PANETTA J, LITTLE S, CLEMENS J

Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20:592-603

STONE J, YOUNG W, SMITH C, SOLOMON R, WALD A, OSTAPKOVICH N, SHREBNICK D

Do standard monitoring sites reflect true brain temperature when profound hypothermia is rapidly induced and reversed?
Anesthesiology 1995; 82:344-51

STRAUSSBERG R, SHAHAR E, GAT R, BRAND N

Delayed parkinsonism associated with hypotension in a child undergoing open-heart surgery
Dev Med Child Neurol 1993; 35:1011-4

STRIJBOS P, LEACH M, GARTHWAITE J

Vicious cycle involving NA⁺ channels, glutamate release, and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation
J Neurosci 1996; 16:5004-13

SWAIN J, MCDONALD TJ, ROBBINS R, BALABAN R

Relationship of cerebral and myocardial intracellular pH to blood pH during hypothermia
Am J Physiol 1991; 260:H1640-H4

- SZYMUSIAK R, DEMORY A, KITTRELL EM, SATINOFF E
Diurnal changes in thermoregulatory behavior in rats with medial preoptic lesions
Am J Physiol 1985; 249:R219-27
- SZYMUSIAK R, IRIYE T, MCGINTY D
Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamic area of cats
Brain Res Bull 1989; 23:111-20
- TAGA T, KISHIMOTO T
Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines
Annu Rev Immunol 1997; 15:797-819
- TAGUCHI J, GRAF C, WEGENER C, ROSNER G, SAITO R, SATO M, HAYAKAWA T, HEISS W
Hyperthermia augments glutamate accumulation and infarct size in cat focal ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15:S321
- TAKABAYASHI T, VANNIER E, CLARK BD, MARGOLIS NH, DINARELLO CA, BURKE JF, GELFAND JA
A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis
J Immunol 1996; 156:3455-60
- TEATHER LA, PACKARD MG, BAZAN NG
Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation
Learn Mem 2002; 9:41-7
- THOMPSON CB
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease
Science 1995; 267:1456-62
- THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y
Caspases: enemies within
Science 1998; 281:1312-6
- TOMBAUGH GC, SAPOLSKY RM
Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology
J Neurochem 1993; 61:793-803
- TONNESEN E, CHRISTENSEN VB, TOFT P
The role of cytokines in cardiac surgery
Int J Cardiol 1996; 53 Suppl:S1-10
- TRACEY KJ, CERAMI A
Tumor necrosis factor, other cytokines and disease
Annu Rev Cell Biol 1993; 9:317-43
- TREASURE T, NAFTEL DC, CONGER KA, GARCIA JH, KIRKLIN JW, BLACKSTONE EH
The effect of hypothermic circulatory arrest time on cerebral function, morphology, and biochemistry. An experimental study
J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86:761-70

TSATSANIS C, ANDROULIDAKI A, VENIHAKI M, MARGIORIS AN
Signalling networks regulating cyclooxygenase-2
Int J Biochem Cell Biol 2006; 38:1654-61

TURINI ME, DUBOIS RN
Cyclooxygenase-2: a therapeutic target
Annu Rev Med 2002; 53:35-57

VALLIERES L, RIVEST S
Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta
J Neurochem 1997; 69:1668-83

VAN DER LINDEN J, WESSLEN O, TYDEN H, EKROTH R, AHN H
Transcranial Doppler versus thermodilution measurements of cerebral blood flow during cardiac surgery
J Cardiothorac Anesth 1989; 3:68

VANDENABEELE P, DECLERCQ W, BEYAERT R, FIERIS W
Two tumour necrosis factor receptors: structure and function
Trends Cell Biol 1995; 5:392-9

VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM
Cyclooxygenases 1 and 2
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38:97-120

VANICKY I, MARSALA M, MURAR J, MARSALA J
Prolonged postischemic hyperventilation reduces acute neuronal damage after 15 min of cardiac arrest in the dog
Neurosci Lett 1992; 135:167-70

WAAGE A, BRANDTZAEG P, HALSTENSEN A, KIERULF P, ESPEVIK T
The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome
J Exp Med 1989; 169:333-8

WAN S, LECLERC JL, VINCENT JL
Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation
Ann Thorac Surg 1997; 63:269-76

WARNER DS, GIONET TX, TODD MM, MCALLISTER A
Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats
Stroke 1992; 22:1775-81

WARNER TD, MITCHELL JA
Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic
FASEB J 2004; 18:790-804

- WASS CT, CABLE DG, SCHAFF HV, LANIER WL
Anesthetic technique influences brain temperature during cardiopulmonary bypass in dogs
Ann Thorac Surg 1998a; 65:454-60
- WASS CT, LANIER WL, HOFER RE, SCHEITHAUER BW
Temperature changes of greater than one degree Celcius alter funtional neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia
Anesthesiology 1995; 83:325-35
- WASS CT, WAGGONER JR, 3RD, CABLE DG, SCHAFF HV, SCHROEDER DR, LANIER WL
Selective convective brain cooling during hypothermic cardiopulmonary bypass in dogs
Ann Thorac Surg 1998b; 66:2008-14
- WATANABE T, MIURA M, ORITA H, KOBAYASI M, WASHIO M
Brain tissue pH, oxygen tension, and carbon dioxide tension in profoundly hypothermic cardiopulmonary bypass. Pulsatile assistance for circulatory arrest, low-flow perfusion, and moderate-flow perfusion
J Thorac Cardiovasc Surg 1990; 100:274-80
- WEI M, KUUKASJARVI P, LAURIKKA J, PEHKONEN E, KAUKINEN S, LAINE S, TARKKA M
Inflammatory cytokines and soluble receptors after coronary artery bypass grafting
Cytokine 2001; 15:223-8
- WILLIAMS CE, GUNN AJ, MALLARD C, GLUCKMAN PD
Outcome after ischemia in the developing sheep brain: an electroencephalographic and histological study
Ann Neurol 1992; 31:14-21
- WONG B, MCLEAN R, NAYLOR C, SNOW W, HARRINGTON E, GAWEL M, WOODS R, FREMES S
Central-nervous-system dysfunction after warm or hypothermic cardiopulmonary bypass
Lancet 1992a; 339:1383-4
- WONG PC, BARLOW CF, HICKEY PR, JONAS RA, CASTANEDA AR, FARRELL DM, LOCK JE, WESSEL DL
Factors associated with choreoathetosis after cardiopulmonary bypass in children with congenital heart disease
Circulation 1992b; 86:III118-26
- WYPIJ D, NEWBURGER JW, RAPPAPORT LA, DUPLESSIS AJ, JONAS RA, WERNOVSKY G, LIN M, BELLINGER DC
The effect of duration of deep hypothermic circulatory arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: the Boston Circulatory Arrest Trial
J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 126:1397-403
- YAMAGATA K, ANDREASSON KI, KAUFMANN WE, BARNES CA, WORLEY PF
Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids
Neuron 1993; 11:371-86

YANG J, LIN Y, GUO Z, CHENG J, HUANG J, DENG L, LIAO W, CHEN Z, LIU Z, SU B
The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation
Nat Immunol 2001; 2:620-4

YANG K, MU XS, HAYES RL
Increased cortical nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) DNA binding activity after traumatic brain injury in rats
Neurosci Lett 1995; 197:101-4

YEH WC, POMPA JL, MCCURRACH ME, SHU HB, ELIA AJ, SHAHINIAN A, NG M, WAKEHAM A, KHOO W, MITCHELL K, EL-DEIRY WS, LOWE SW, GOEDDEL DV, MAK TW
FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis
Science 1998; 279:1954-8

YONISH-ROUACH E, RESNITZKY D, LOTEM J, SACHS L, KIMCHI A, OREN M
Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6
Nature 1991; 352:345-7

ZARUBIN T, HAN J
Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway
Cell Res 2005; 15:11-8

ZAUSINGER S, HUNGERHUBER E, BAETHMANN A, REULEN H, SCHMID-ELSAESSER R
Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms
Brain Res 2000; 863:94-105

ZHANG W, POTROVITA I, TARABIN V, HERRMANN O, BEER V, WEIH F, SCHNEIDER A, SCHWANINGER M
Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia
J Cereb Blood Flow Metab 2005; 25:30-40

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung und -größe	44
Tabelle 2: Proteine und ihre Gele mit entsprechendem Polyacrylamidanteil in %.....	64
Tabelle 3: Proteine mit ihren jeweiligen Verdünnungen und Antikörpern.....	66
Tabelle 4: Physiologische Parameter der zwei Wiedererwärmungsmethoden während der operativen Phase mit tief hypothermen Kreislaufstillstand	72
Tabelle 5: Neurologische Parameter im Verhältnis zur jeweiligen Wiederer- wärmungsmethode.....	75
Tabelle 6: Relative Intensität der Chemilumineszenz für COX-2 und I-kB.....	80
Tabelle 7: Vergleich der Menge doppelt markierter NF-kB-/NeuN positiver Neurone innerhalb der Doppelfärbung (absolut).....	82
Tabelle 8: Gesamtzahl der lichtmikroskopisch gezählten eosinophilen Neurone in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je n = 10)	84

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der neurotoxischen Kaskade, modifiziert nach (JOHNSTON et al., 2001).	13
Abbildung 2: Ausschnitt aus der Inflammationskaskade.	20
Abbildung 3: Rezeptortypen und deren Verhältnis zu Aktivierung und Inhibition des programmierten Zelltods und Inflammation, modifiziert nach BAUD und KARIN, 2001.	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von NF- κ B in der Zelle, modifiziert nach PAPARELLA et al., 2002.	28
Abbildung 5: NF- κ B -Wege der Aktivierung, aus LI und VERMA, 2002.	30
Abbildung 6: Aufbau der Extrakorporalen Zirkulation.	49
Abbildung 7: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Beam-Walking-Test a) frontal und b) seitlich fotografiert.	56
Abbildung 8: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Beam-Balance-Test.	56
Abbildung 9: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte während der Untersuchung am Drahtgitter a) in 90° - Position und b) in 180° - Position.	57
Abbildung 10: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Prehensile-Traction-Test.	58
Abbildung 11: Beispiel einer nicht geschädigten Ratte beim Klettern.	59
Abbildung 12: Untersuchung der Propriozeption am Beispiel einer nicht geschädigten Ratte.	59
Abbildung 13: Untersuchung der Vibrissenreaktion am Beispiel einer gesunden Ratte.	60
Abbildung 14: Untersuchung des Hörvermögens am Beispiel einer Ratte a) durch Klatschen in die Hände und b) durch Finger schnipsen.	61
Abbildung 15: Untersuchung des Sehvermögens am Beispiel einer Ratte.	62
Abbildung 16: Elektrophoresekammer mit befüllten SDS-Gelen.	64
Abbildung 17: Geöffnete Transferkammer mit Gel, Membran und Pufferpapieren.	65
Abbildung 18: Vergleichende graphische Darstellung der MW \pm SEM der Anzahl der Fehlritte zum jeweiligen Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- oder postoperativ) je nach Wiedererwärmungsmethode. Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.	76
Abbildung 19: Graphische Darstellung der MW \pm SEM der Verweildauer (Beam-Balance-Zeit in s) zum Zeitpunkt der jeweiligen neurologischen Untersuchung und der Wiedererwärmungsmethode.	76
Abbildung 20: Graphische Darstellung der MW \pm SEM der Verweildauer (Rotating-Grid-Zeit in s) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- oder postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode.	77
Abbildung 21: Graphische Darstellung der MW \pm SEM der Haltezeit (Prehensile-Traction-Zeit in s) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- und postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode. Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wieder-erwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.	78
Abbildung 22: Graphische Darstellung der MW \pm SEM der Sensitivität (Punktesumme) zum Zeitpunkt der neurologischen Untersuchung (prä- und postoperativ) und der jeweiligen Wiedererwärmungsmethode.	79

Abbildung 23: Vergleichende graphische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Chemilumineszenz für COX-2 in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je n = 10). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.....	81
Abbildung 24: Vergleichende graphische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Chemilumineszenz für I-kB in den jeweiligen Versuchsgruppen (je n = 10).	82
Abbildung 25: Vergleichende graphische Darstellung der Anzahl NF-kB-/NeuN- positiv doppelt markierter Neurone in den einzelnen Untersuchungsgruppen (je n = 10). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.....	83
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Gesamtzahl eosinophil gefärbter Neurone via HE-Färbung durch Auszählen der fünf Gehirnregionen aller drei Untersuchungsgruppen (je n = 10) erhoben. Signifikanzen: * = $p < 0,05$, langsame Wiedererwärmungsgruppe respektive schnelle Wiedererwärmungsgruppe zur Nativgruppe.....	85

10 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
Akt.	aktiver
AP	Aktivatorprotein
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base excess
BGBI	Bürgerliches Gesetzbuch Band I
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cl	Chlorid
ca.	cirka
CD28	Zelloberflächenmolekül, beteiligt an der Erkennung von Antigen durch T-Zellrezeptoren
CDF	Cholinergic differentiation factor
CHD	kongenitale Herzdefekte
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co.KG	Compagnie, Kommanditgesellschaft
COX	Zyklooxygenase
CPAP	kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck
CPB	Cardiopulmonary Bypass
c-Rel	c-Relish Protein, Untereinheit der NF-κB p68-Untereinheit
d	Durchmesser
d.	der
DAP	diastolischer arterieller Blutdruck
DB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
d.h.	das heißt
DHCA	tiefer hypotemer Kreislaufstillstand
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
Dipl. Ing.	Diplom Ingenieur
EEG	Elektro-Enzephalogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
F.	Fassung
Fa.	Firma
FADD	„FAS-associated death domain protein“
Fas	auch APO-1 genannt; Apoptose auslösender Zelloberflächenrezeptor
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff Konzentration
g	Gramm
GEF	Guanidine-exchange factor Proteine
ggf.	gegebenenfalls

h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin (Hämalaun)-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
H ₂ O ₂	Wasserstoffdioxid
HPF	„High Power Field“
i.	in
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IgG	Antikörper der Immunglobulinklasse G
I-kB	inaktives kappa B
I-kB α	inaktives kappa B α
IKK α /1	inaktive kappa B Kinase- α /1} Enzym, das an der Umsetzung von I-kB beteiligt ist
IKK β /2	inaktive kappa B Kinase- β /2} Enzym, das an der Umsetzung von I-kB beteiligt ist
IL	Interleukin
IL-6-R α	Interleukin-6-Rezeptor α
Inc.	Incorporated, Bestandteil des Firmennamens von amerikanischen Unternehmen, die der deutschen Aktiengesellschaft (AG) entsprechen
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
IQ	Intelligenzquotient
IRAK	IL-1-receptor-associated kinase
i.v.	intravenös
IVC	Vena cava inferior
JNK	c-Jun-N-Terminalkinase
K ⁺	Kalium
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KGW	Körpergewicht
LIF	Leukaemia inhibitorischer Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
Lux	Maßeinheit des SI für die Beleuchtungsstärke
M.	Musculus
mA	milli-Ampère; Maßeinheit der elektrischen Spannung
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinasehomolog
MALT	Mucosa-assoziierte Lymphoidgewebeprotein
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Kinase Kinase
MEK	Mitogen-Extrazelluläre-Signalregulierende Kinase
MEKK3	Kinase Kinase 3
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Maßeinheit für die Stoffmenge
MRI	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88

Na	Natrium
NeuN	Mouse anti-neuronal nuclei
NF-kB	Nuklearfaktor kappa B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxidsynthetase
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase mit 38 Kilodalton Größe
p50	Untereinheit von NF-kB mit 50 Kilodalton Größe, auch als NF-kB1 bezeichnet
p52	Koaktivator der Transkription, auch als NF-kB2 bezeichnet
p53	Tumorsuppressorprotein, Transkriptionsfaktor kontrolliert Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur
p65 (RelA)	Untereinheit von NF-kB mit 50 Kilodalton Größe
p38 MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Kinase
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
P _{et}	endtidaler Druck
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
PE	Polyethylen
PGE ₂	Prostaglandin E2
pH-stat	Temperatur-korrigierte Interpretation der Blutgaswerte
pH-Wert	Wasserstoffionen-Wert
PKCθ	Proteinkinase Cθ
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QRS	Ausschläge im EKG (Kammeranfangsschwankung)
RelB	eines von 5 verschiedenen NF-kB-Proteinen, siehe p 65, c-Rel, p50 und p52
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein /Threoninkinase
RPM	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S.	Seite
SAP	systolischer arterieller Blutdruck
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
STH	Somatotropes Hormon
SVC	Vena cava superior
TAK1	transforming-growth-factor-β-activated kinase 1
TAB	TAK1-binding protein
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGA	Transposition der großen Arterien
TGFβ	„Transforming Growth Factor-beta 1“, Zytokin, spielt Rolle in der Apoptose
Th2	T-Helferzellen
TierschG	Tierschutzgesetz
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRAF	„TNF-receptor-associated factor“

TRADD	Tumornekrosefaktorrezeptor1-assoziiertes „death domain“ Protein
U	Kurzzeichen für Unit (engl. = Einheit) oder Umdrehungen?
UV	Ultraviolett
V	Volt; Maßeinheit der elektrischen Spannung
V.	Vena
v.a.	vor allem
Vol %	Volumen Prozent
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervöses System
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
§	Paragraph
%	Prozent

11 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Erhard danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein großer Dank gilt zugleich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. E. F. Kochs, Direktor und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der statistischen Bearbeitung.

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und die jederzeit freundliche Beratung und Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann für ihre große Geduld, Motivation und den permanenten Rückhalt.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. med. L. Gordon für ihre stets vorhandene Bereitschaft zur hilfreichen Diskussion, als auch Frau Dr. med. B. Jungwirth für die Hilfe bei statistischen Fragen.

Vielen Dank an die Kolleginnen der Forschungsgruppe „Kognition und Verhalten“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München Frau Dr. med. vet. Anja Berkmann und Frau Dr. med. vet. Laura Starker für die Unterstützung während der gesamten Zeit an diesem Institut.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kolleginnen Katja Klemmer, Katinka Schellenberger und Claudia Steinbicker für die stets gute Zusammenarbeit und moralische Unterstützung.

Ich möchte mich auch bei Frau Doris Droese und Frau Anne Frye für die reibungslose Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die unermüdliche finanzielle und moralische Unterstützung. Ohne Euch wäre dieses Werk nie möglich gewesen!